

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001年3月8日 (08.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/16315 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/12, C07K 14/47, C12Q 1/68, C07K 19/00, 16/18, C12N 5/10, A61K 38/17, 45/00, A61P 25/28, G01N 33/53, A01K 67/027

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 芳賀達也 (HAGA, Tatsuya) [JP/JP]; 〒249-0004 神奈川県逗子市沼間二丁目3番1号 411号室 Kanagawa (JP). 奥田隆志 (OKUDA, Takashi) [JP/JP]; 〒202-0002 東京都保谷市ひばりヶ丘北四丁目1番6号 リズひばりヶ丘101号室 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/05545

(22) 国際出願日: 2000年8月18日 (18.08.2000)

(74) 代理人: 廣田雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒107-0052 東京都港区赤坂二丁目8番11号 第11赤坂葵ビル502 Tokyo (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): CA, US.

(30) 優先権データ:  
特願平11/240642 1999年8月27日 (27.08.1999) JP  
特願平11/368991 1999年12月27日 (27.12.1999) JP

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (CH, DE, ES, FR, GB, IT, SE).

添付公開書類:

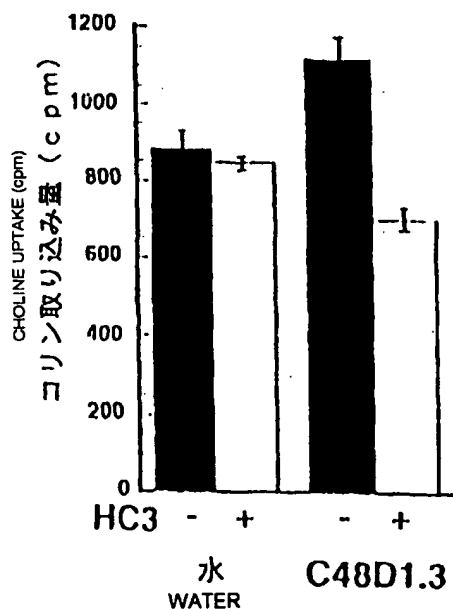
— 国際調査報告書

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町四丁目1番8号 Saitama (JP).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: slGH AFFINITY CHOLINE TRANSPORTER

(54) 発明の名称: 高親和性コリントランスポーター



(57) Abstract: A protein having a high affinity choline transporter activity which is important physiologically; a gene encoding the protein; and a method of screening a substance promoting the high affinity choline transporter activity with the use of the same, etc. The high affinity choline uptake activity of Na<sup>+</sup>-dependent transporter cDNA deduced from the genomic sequence of a nematode (*C. elegans*) is examined in a *Xenopus laevis* oocyte expression system to thereby identify the cDNA (cho-1) of nematode high affinity choline transporter. By using the homology of a base sequence with this cDNA as an indication, the cDNA (CHT1) of rat high affinity choline transporter is cloned from rat spinal cord. Similarly, the cDNA of human high affinity choline transporter is cloned from human genome.

WO 01/16315 A1

[続葉有]



---

(57) 要約:

生理的に重要である高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質、それをコードする遺伝子及びそれらを利用した高親和性コリントランスポーター活性促進物質のスクリーニング方法等を提供するものである。線虫 (*C. elegans*) のゲノム配列から予測される  $\text{Na}^+$  依存性トランスポーター cDNA についてアフリカツメガエルの卵母細胞発現系で高親和性コリン取り込み活性を調べることにより、線虫高親和性コリントランスポーターの cDNA (cho-1) を同定し、この cDNA との塩基配列の相同性を指標にラット脊髄からラット高親和性コリントランスポーターの cDNA (CHT1) をクローニングする。同様に、ヒトゲノムからヒト高親和性コリントランスポーターの cDNA をクローニングする。

## 明 細 書

## 高親和性コリントランスポーター

## 5 技術分野

本発明は、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質、それをコードする遺伝子及びそれらの利用に関する。

## 背景技術

- 10 全身の臓器に分布し、内分泌系と並んでエネルギー代謝、循環、呼吸及び生殖など生体にとって最も基本的な機能を調節する神経系である自律神経は、アドレナリン作動性とコリン作動性に分類される。交感神経の節後繊維以外のすべての自律神経繊維、運動神経繊維、交感神経のうち汗腺・血管拡張繊維はコリン作動性神経であり、運動・自律神経機能
- 15 に重要である。脳にも存在するコリン作動性神経は、脳の認知機能に重要であり、アルツハイマー病では変性することが知られている。また、コリン作動性神経では、コリン生合成能を欠いているため、アセチルコリン分解産物のコリンはシナプス前部に存在する高親和性コリントランスポーターによって細胞内に取り込まれ、アセチルコリン合成に再利用
- 20 される。この高親和性コリンの取り込みはアセチルコリン合成の律速段階であり、シナプス伝達の効率を調節すると考えられている (J. Neurochem. 18, 781-798, 1971, Science 178, 626-628, 1972, Biochem. Biophys. Acta 291, 564-575, 1973, Mol. Pharmacol. 9, 630-639, 1973, J. Pharmacol. Exp. Ther. 192, 86-94, 1975, J. Neurochem. 30, 15-21,
- 25 1978, J. Neurochem. 44, 11-24, 1985, J. Neurochem. 60, 1191-1201, 1993, J. Neurochem. 20, 581-593, 1973, Eur. J. Pharmacol. 102,

369-370, 1984)。従来、主要な神経伝達物質トランスポーターのほとんどの cDNA は単離されているが、生理的に重要である高親和性コリントランスポーターの cDNA は同定されていない。

## 5 発明の開示

コリン作動性神経に局在し、アセチルコリンの前駆体であるコリンを細胞内に取り込む作用をするタンパク質の存在がこれまでに予想されており、このタンパク質である高親和性コリントランスポーターの分子的性質は不明であった。本発明の課題は、生理的に重要である高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質、それをコードする遺伝子及びそれらを利用した高親和性コリントランスポーター活性促進物質のスクリーニング方法等を提供することにある。

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究し、ゲノム・プロジェクトの情報 (Science 282, 2012-2018, 1998) を利用して、線虫 (*C. elegans*) のゲノム配列から予測される  $\text{Na}^+$  依存性トランスポーター cDNA を 1 つひとつクローニングし、そのそれぞれについてアフリカツメガエルの卵母細胞発現系で高親和性コリン取り込み活性を調べることにより、線虫高親和性コリントランスポーターの cDNA (*cho-1*) を同定し、この cDNA との塩基配列の相同性を指標にラット脊髄から相同分子 (CHT1) をクローニングした。この CHT1 は神経伝達物質トランスポーター (J. Neurochem. 71, 1785-1803, 1998) との相同性をもたないが、 $\text{Na}^+$  依存性グルコーストランスポーターファミリーに属する分子 (Nature 330, 379-381, 1987) に対して 20-25% の相同性を有していた。

ノザン解析の結果、脊髄、前脳基底部、線条体、脳幹に局限して CHT1 の転写産物が確認され、CHT1 はコリン作動性神経で発現してい

と考えられたので、CHT1をアフリカツメガエルの卵母細胞で発現させると、 $\text{Na}^+$ 依存的で、ヘミコリニウム-3で完全に阻害されるコリン取り込み活性が観察された。これらの結果から、CHT1が高親和性コリントランスポーター活性を有することを見い出した。また、本発明者らは、ヒト及びマウス由来のコリントランスポーターcDNAをクローニングし、その塩基配列を決定し、その発現産物が高親和性コリン取り込み活性を有することを確認した。本発明は以上のようにして完成するに至ったものである。

- すなわち本発明は、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子（請求項1）や、以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質(b)配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質（請求項2）や、配列番号1に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むDNA（請求項3）や、請求項3記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする線虫由来のDNA（請求項4）や、以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子(a)配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質(b)配列番号4に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質（請求項5）や、配列番号3に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むDNA（請求項6）や、請求項6記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下で

ハイブリダイズし、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードするラット由来のDNA（請求項7）や、以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子(a)配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質(b)配列番号6に示されるアミノ酸配列

5 において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質（請求項8）や、配列番号5に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むDNA（請求項9）や、請求項9記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェント

10 な条件下でハイブリダイズし、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードするヒト由来のDNA（請求項10）や、以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子(a)配列番号8に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質(b)配列番号8に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは

15 付加されたアミノ酸配列からなり、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質（請求項11）や、配列番号7に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むDNA（請求項12）や、請求項12記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ高親和性コリント

20 ランスポーター活性を有するタンパク質をコードするマウス由来のDNA（請求項13）に関する。

また本発明は、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質（請求項14）や、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（請求項15）や、配列番号2に示されるアミノ酸配列におい

25 て、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ線虫高親和性コリントランスポーター活性を有す

るタンパク質（請求項 16）や、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（請求項 17）や、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつラット高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質（請求項 18）や、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（請求項 19）や、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつヒト高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質（請求項 20）や、配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（請求項 21）や、配列番号 8 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつマウス高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質（請求項 22）に関する。

また本発明は、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質と、マーカータンパク質及び／又はペプチドタグとを結合させた融合タンパク質（請求項 23）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 15 又は 16 記載の線虫高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 23 記載の融合タンパク質（請求項 24）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 17 又は 18 記載のラット高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 23 記載の融合タンパク質（請求項 25）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 19 又は 20 記載のヒト高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 23 記載の融合タンパク質（請求項 26）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、

請求項 2 1 又は 2 2 記載のマウス高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 2 3 記載の融合タンパク質（請求項 2 7）に関する。

- また本発明は、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質に特異的に結合する抗体（請求項 2 8）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 1 5 又は 1 6 記載の線虫高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 2 8 記載の抗体（請求項 2 9）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 1 7 又は 1 8 記載のラット高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 2 8 記載の抗体（請求項 3 0）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 1 9 又は 2 0 記載のヒト高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 2 8 記載の抗体（請求項 3 1）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 2 1 又は 2 2 記載のマウス高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 2 8 記載の抗体（請求項 3 2）や、抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 2 8 ～ 3 2 のいずれか記載の抗体（請求項 3 3）に関する。
- また本発明は、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞（請求項 3 4）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 1 5 又は 1 6 記載の線虫高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 3 4 記載の宿主細胞（請求項 3 5）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 1 7 又は 1 8 記載のラット高親和性コリントランスポーター



活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 3 4 記載の宿主細胞（請求項 3 6）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 1 9 又は 2 0 記載のヒト高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 3 4 記載の宿主細胞（請求項 3 7）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 2 1 又は 2 2 記載のマウス高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 3 4 記載の宿主細胞（請求項 3 8）に関する。

また本発明は、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損又は過剰発現することを特徴とする非ヒト動物（請求項 3 9）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 1 5 又は 1 6 記載の線虫高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 3 9 記載の非ヒト動物（請求項 4 0）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 1 7 又は 1 8 記載のラット高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 3 9 記載の非ヒト動物（請求項 4 1）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 1 9 又は 2 0 記載のヒト高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 3 9 記載の非ヒト動物（請求項 4 2）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 2 1 又は 2 2 記載のマウス高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 3 9 記載の非ヒト動物（請求項 4 3）や、非ヒト動物が、マウス又はラットであることを特徴とする請求項 3 9 ～ 4 3 のいずれか記載の非ヒト動物（請求項 4 4）に関する。

また本発明は、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した細胞に、請求項 8 ～ 10 のいずれか記載の遺伝子又は DNA を導入することを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞の調製方法（請求項 4 5）や、高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞が、請求項 8 ～ 10 のいずれか記載の遺伝子又は DNA が染色体にインテグレートされ、ステイブルに高親和性コリントランスポーター活性を示す細胞であることを特徴とする請求項 4 5 記載の高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞の調製方法（請求項 4 6）や、請求項 4 5 又は 4 6 記載の高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞の調製方法により得られることを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞（請求項 4 7）に関する。

また本発明は、被検物質の存在下、請求項 1 4 ～ 2 2 のいずれか記載の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の高親和性コリントランスポーター活性を測定・評価することを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項 4 8）や、被検物質の存在下、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を発現している細胞膜又は細胞をインビトロで培養し、該細胞膜又は該細胞における高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性及び／又は発現量を測定・評価することを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法（請求項 4 9）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を発現している細胞膜又は細胞が、請求項 3 4 ～ 3 8 のいずれか記載の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞又は

- 請求項 4 7 記載の高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞であることを特徴とする請求項 4 9 記載の高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法（請求項 5 0）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、組換えタンパク質であることを特徴とする請求項 4 8 ～ 5 0 のいずれか記載の高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法（請求項 5 1）や、被検物質の存在下、請求項 3 9 ～ 4 4 のいずれか記載の
- 5 非ヒト動物から得られた細胞をインビトロで培養し、該細胞における高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性及び／又は発現量を測定・評価することを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法（請求項 5 2）や、被
- 10 検物質を非ヒト動物に投与し、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性及び／又は発現量を評価することを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法（請求項 5 3）や、高親和性コリントランスポーター活性を有する
- 15 タンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損又は過剰発現した非ヒト動物に被検物質を投与し、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性及び／又は発現量を評価することを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法（請求項 5 4）や、高親和性コリントランスポーター活性を有する
- 20 タンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損又は過剰発現し
- 25

- た非ヒト動物に被検物質を投与し、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性及び／又は発現量を野生型非ヒト動物の場合と比較・評価することを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法（請求項 5 5）や、非ヒト動物が、マウス又はラットであることを特徴とする請求項 5 2～5 5 のいずれか記載の高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法（請求項 5 6）に関する。
- 10      また本発明は、請求項 4 8～5 6 のいずれか記載のスクリーニング方法により得られる高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性若しくは発現を促進する物質（請求項 5 7）や、請求項 4 8～5 6 のいずれか記載のスクリーニング方法により得られる高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性若しくは発現を抑制する物質（請求項 5 8）や、高親和性コリントランスポーターの活性増加又は発現増強を必要としている患者を治療するのに用いられる医薬組成物であって、有効成分として請求項 1 4～2 2 のいずれか記載のタンパク質及び／又は請求項 5 7 記載の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性若しくは発現を促進する物質を含んでなる医薬組成物（請求項 5 9）や、高親和性コリントランスポーターの活性又は発現の抑制を必要としている患者を治療するのに用いられる医薬組成物であって、有効成分として請求項 1 4～2 2 のいずれか記載のタンパク質及び／又は請求項 5 8 記載の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性若しくは発現を抑制する物質を含んでなる医薬組成物（請求項 6 0）に関する。
- 20      また本発明は、検体中の高親和性コリントランスポーターをコードす

るDNA配列を、請求項19又は20記載のタンパク質をコードするDNA配列と比較することを特徴とする高親和性コリントランスポーターの発現又は活性と関連する疾病の診断方法（請求項61）や、請求項19又は20記載のタンパク質をコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部からなるアルツハイマー症の診断用プローブ（請求項62）や、請求項62記載の診断用プローブ及び／又は請求項28～33のいずれか記載の抗体を含有することを特徴とするアルツハイマー症の診断薬（請求項63）に関する。

#### 10 図面の簡単な説明

第1図は、本発明の線虫cho-1（C48D1.3 cRNA）または水を注入したアフリカツメガエル卵母細胞の $[^3\text{H}]$ コリンの取り込み結果を示す図である。

第2図は、本発明の線虫cho-1（C48D1.3 cRNA）または水を注入したアフリカツメガエル卵母細胞の $\text{Na}^+$ の依存性によるコリン取り込みに対する効果の結果を示す図である。

第3図は、本発明の線虫cho-1（C48D1.3 cRNA）または水を注入したアフリカツメガエル卵母細胞のHC3によるコリン取り込みの阻害の結果を示す図である。

第4図は、本発明のラットCHT1及び線虫CHO-1のそれぞれのアミノ酸配列を示す図である。

第5図は、線虫の神経系で本発明のcho-1::gfpを発現している神経細胞の分布を示す図である。

第6図は、 $\text{Na}^+$ 依存性グルコーストランスポーターファミリーの系統樹を示す図である。

第7図は、本発明のラットCHT1の予想されるトポロジーを示す図

である。

第 8 図は、本発明のラット組織での C H T 1 m R N A 転写産物のノザン解析の結果を示す図である。

5 第 9 図は、本発明のラット脳における C H T 1 転写産物の in situ ハイブリダイゼーション解析の結果を示す図である。

第 1 0 図は、本発明の脊髄における C H T 1 転写産物の in situ ハイブリダイゼーション解析の結果を示す図である。

第 1 1 図は、本発明の C H T 1 c R N A または水を注入したアフリカツメガエル卵母細胞の  $[^3\text{H}]$  コリンの取り込みの結果を示す図である。

10 第 1 2 図は、本発明の C H T 1 のコリン濃度によるコリン取り込みに対する効果を示す図である。

第 1 3 図は、本発明の C H T 1 の H C 3 によるコリン取り込みの阻害の結果を示す図である。

15 第 1 4 図は、本発明の C H T 1 の  $\text{Na}^+$  及び  $\text{Cl}^-$  依存性によるコリン取り込みの結果を示す図である。

第 1 5 図は、本発明の C H T 1 c D N A あるいはベクター p c D N A 3. 1 をそれぞれ導入した C O S 7 細胞から調製した膜への  $[^3\text{H}]$  H C 3 結合結果を示す図である。

20 第 1 6 図は、本発明の C H T 1 c D N A あるいはベクター p c D N A 3. 1 をそれぞれ導入した C O S 7 細胞から調製した膜への特異的  $[^3\text{H}]$  H C 3 結合の飽和解析の結果を示す図である。

第 1 7 図は、本発明の H C 3、コリン (C h o)、アセチルコリン (A c h) による特異的  $[^3\text{H}]$  H C 3 結合の置換の結果を示す図である。

## 25 発明を実施するための最良の形態

本発明の配列番号 1 に記載される線虫高親和性コリントランスポータ

一の cDNA は、C. elegans ゲノム・プロジェクトから Na<sup>+</sup> 依存性トランスポーターファミリーのメンバーと予測される完全長の候補 cDNA から調製したそれぞれの cRNA を、アフリカツメガエル卵母細胞に注入し高親和性コリン取り込みを調べることにより得ることができる。

- 5    その際、哺乳類の脳シナプトソームでは高親和性コリン取り込みは 1  $\mu$  M の HC 3 で完全に阻害される ( $K_i = 10 - 100$  nM) のに対し、あらゆる細胞に分布している低親和性コリン取り込みはより高濃度の HC 3 でのみ阻害される ( $K_i = 50$   $\mu$  M) ことから、1  $\mu$  M のヘミコリンニウム-3 (hemicholinium-3; HC 3) に対する感受性を高親和性コリン取り込みの判断基準とすることができる。例えば、以下のようにして線虫 (C. elegans) の候補 cDNA から目的とする遺伝子の同定、発現、局在を確かめることができる。
- 10

- 高親和性コリン取り込みにおいて、C 4 8 D 1. 3 と予測された遺伝子に相当する cDNA は 1  $\mu$  M の HC 3 で阻害される有意なコリン取り込みを促すことが分かった。図 1 には、C 4 8 D 1. 3 cRNA または水を注入したアフリカツメガエル卵母細胞の [<sup>3</sup>H] コリンの取り込み結果が示されている。図 1 中、黒と白のカラムは 1  $\mu$  M の HC 3 の非存在下、存在下でのコリン取り込みをそれぞれ示し、それぞれのカラムは平均  $\pm$  SEM ( $n = 6 \sim 8$  卵母細胞) で表示されている。また図 2 には、Na<sup>+</sup> のコリン取り込みに対する効果が示され、黒カラムは標準溶液中で測定したコリン取り込みを示し ( $[Na^+] = 100$  mM)、白カラムは Na<sup>+</sup> 非存在下でのコリン取り込みを示している (Na<sup>+</sup> は Li<sup>+</sup> に置き換えられた)。さらに図 3 には HC 3 によるコリン取り込みの阻害が示されている。かかる図 2, 3 から、この取り込みは Na<sup>+</sup> 依存性であり、
- 20
- 25    HC 3 の  $K_i$  は 50 nM と推定された。この cDNA クローンは ch o - 1 (high-affinity choline transporter-1) と名付けられた。

cDNAとゲノムの塩基配列の比較により、cho-1遺伝子は9つのエクソンからなることが分かった。cho-1のcDNAの塩基配列から予想されるタンパク質は576アミノ酸残基であり(図4参照)、この配列番号2に示されるタンパク質は常法により作製することができる。

- 5 また、入手できるデータベースを検索したところcho-1のアミノ酸配列はNa<sup>+</sup>依存性グルコーストランスポーターファミリーのメンバーに対して弱いながら有意な相同性を示した。疎水性分析と他のトランスポーターとの比較から12回膜貫通領域をもつことが示唆される(図7参照)。
- 10 次に、線虫(*C.elegans*)の神経系でcho-1を発現している細胞を同定するために、cho-1遺伝子上流5.1kbの領域を融合させたグリーン蛍光タンパク質(GFP)遺伝子を線虫に導入し、cho-1::gfpを発現している神経細胞の分布を調べた。cho-1::gfp レポーターDNAを染色体外に保持しているL1幼虫の写真を図5として示す(スケール
- 15 バー; 50 μm)。図5中、矢頭は神経環を示す。腹部神経索ではGFPはコリン作動性運動神経においてのみ発現しているが、おそらく染色体外のレポーターDNAが欠失したためにいくつかのDA、DB神経細胞はGFPを発現していない。これはcho-1がコリン作動性神経の高親和性コリントランスポーターであることを裏付けている。
- 20 本発明の配列番号3に記載されるラット高親和性コリントランスポーターのcDNAは、例えば次のようにして調製することができる。脊椎動物のcho-1相同分子に注目し、cho-1から予想されるアミノ酸配列でデータベースを検索し、ヒトの genomic survey sequence (GSS) で一つの候補 (GenBank accession number : AQ316435) を同定
- 25 した。このヒトのゲノムDNAとcho-1の塩基配列の相同性に基づき、縮重プライマーを用いたPCRでラット脊髄cDNAからcDNA



断片を増幅した。この断片を使ってラット脊髄 cDNA ライブラリーをスクリーニングし陽性の cDNA クローンを得た。最長の読み枠の塩基配列から cho-1 と 51% の同一性および 70% の類似性を示す 580 アミノ酸残基のタンパク質が予想された (図 4 参照)。このラット cDNA クローンは CHT 1 と名付けられた。図 4 には、ラット CHT 1 と線虫 CHO-1 のそれぞれのアミノ酸配列が、同一残基は黒囲みで、類似残基はグレー囲みで表示されている。予想される膜貫通領域 I-XII は下線が引かれている。この配列番号 4 で示されるタンパク質は常法により作製することができる。

- 10 上記 CHT 1 のアミノ酸配列は  $\text{Na}^+$  依存性グルコーストランスポーターファミリーのメンバーと有意な相同性を有する (20-25%)。遺伝研究所 (三島、日本) のプログラム CLUSTALW を用いて neighbor-joining 法で作製した  $\text{Na}^+$  依存性グルコーストランスポーターファミリーの系統樹を図 6 に示す。図 6 には、ラット CHT 1 に対してそれぞれのタンパク質が含む同一のアミノ酸の割合 % が右側に示されている。一方、酵母のコリントランスポーター (J. Biol. Chem. 265, 15996-16003, 1990)、当初は高親和性コリントランスポーターと報告されていたクレアチントランスポーター (Biochem. Biophys. Res. Commun. 198, 637-645, 1994)、及び他の神経伝達物質トランスポーターとは相同性を
- 15
- 20 もたない。

CHT 1 の予想されるトポロジーは線虫 CHO-1 と本質的に同じであると考えられ、ラット CHT 1 の予想されるトポロジーを図 7 に示す。図 7 中、黒の円は同一残基、グレーの円はよく保存された残基、白の円は類似していない残基を示す。枝線は予想される糖鎖付加部位を示す。

- 25 円中の P はタンパク質キナーゼ C によるリン酸化予想部位を示す。

次に、ノザン解析や in situ ハイブリダイゼーションで CHT 1 の m

RNAの発現分布を調べた。ラットのさまざまな組織のノザン解析からおよそ5 kbの長さの転写産物の発現を確認した。図8には、ラット組織でのCHT1のmRNA転写産物のノザン解析の結果が示されている。また、RNAの標準(0.24-9.5 kb; GIBCO BRL)の長さが左

5 示されている。図8からわかるように、前脳基底部や脳幹、脊髄で多く、線条体では少なかった。これらの組織はいずれもコリン作動性神経を含むことが知られている。一方、脳の他の領域や非神経系の組織では転写産物は確認されなかった。

これらの結果と一致して、in situ ハイブリダイゼーションでは線条

10 体、前脳基底部の細胞群、脊髄前角を含む主要なコリン作動性神経の細胞集団でCHT1のmRNAの発現が確認された。図9及び図10(スケールバー; 1 mm)には、ラット脳及び脊髄におけるCHT1転写産物のin situ ハイブリダイゼーション解析に関する、ジゴキシゲニンでラベルされたアンチセンスのcRNAプローブにハイブリダイズされた

15 明視野での切片の顕微鏡写真が図示されている。図9から、CHT1のmRNA転写産物は vertical 及び horizontal limbs of the diagonal band (VDB, HDB), medial septal nucleus (MS), caudate and putamen (CPu), olfactory tubercle (Tu)で検出されていることが、図10から脊髄では前角(VH)で発現が観察されることがわかる。また、小胞アセチル

20 コリントランスポーターのプローブでハイブリダイズされた隣の切片も本質的に同様な分布を示した。この発現分布はすでに報告されているコリンアセチル基転移酵素や小胞アセチルコリントランスポーターの分布と本質的に同じである。これらの結果はCHT1のmRNAがコリン作動性神経に限局して発現していることを示している。

25 次にCHT1によるコリン取り込みをアフリカツメガエル卵母細胞で調べた。CHT1のcRNAを注入した卵母細胞のコリン取り込みは水

を注入したコントロールよりも2-4倍高かった。図11には、CHT1のcRNAまたは水を注入したアフリカツメガエル卵母細胞の $[^3\text{H}]$ コリンの取り込み結果が示されている。図11中、黒と白のカラムは100mMのNaClあるいはLiClを含む標準溶液でのコリン取り込みをそれぞれ示し、それぞれのカラムは平均 $\pm$ SEM ( $n=6\sim 8$  卵母細胞)で表示されている。またコリン濃度のコリン取り込みに対する効果が図12に示されている。図12においては、水を注入した卵母細胞の取り込みをcRNAのそれから差し引いて、CHT1によるコリン取り込みを算出し、取り込みはミカエリス・メンテンの曲線に近似させている。図12に示されるように、CHT1のコリン取り込みはコリン濃度を増加させると飽和した ( $K_m=2.2\pm 0.2\ \mu\text{M}$ ,  $n=3$ )。

次に、HC3によるコリン取り込みの阻害の結果を図13に示す。図13から、コントロールの内因性のコリン取り込みの $K_m$ は $10\ \mu\text{M}$ より高く、CHT1のコリン取り込みは $0.1\ \mu\text{M}$ のHC3で完全に阻害される ( $K_i=2-3\ \text{nM}$ ) のに対して、コントロールでは $10\ \mu\text{M}$ のHC3でわずかしき阻害されることがわかる。図14に示されるように、CHT1のコリン取り込みのイオン依存性を調べると $\text{Na}^+$ だけでなく $\text{Cl}^-$ 依存性であることがわかった。黒と白のカラムは水を注入した卵母細胞のコリン取り込み、cRNAを注入した卵母細胞のコリン取り込みをそれぞれ示す (標準溶液中の100mMのNaClは図で示されているそれぞれの100mMの塩で置換)。これらの結果は脳シナプトソームの高親和性コリン取り込みから期待される特性 (コリンに対する高い親和性、HC3に対する高い感受性、 $\text{Na}^+-\text{Cl}^-$ 依存性) をCHT1がもつことを示している (J. Neurochem. 27, 93-99, 1976)。

また、CHT1のcDNAとベクター (コントロール) をそれぞれ導入したCOS7細胞から調製した膜の $[^3\text{H}]$ HC3結合活性を調べた。

結果を図 15 に示す。図 15 からわかるように、CHT1 を発現させた細胞の膜では  $\text{Na}^+$  依存的な  $[^3\text{H}] \text{HC3}$  結合が観察されたが、コントロールの膜では観察されなかった。次に、特異的  $[^3\text{H}] \text{HC3}$  結合の飽和解析を行った。図 16 に示されるように、平衡解離定数 ( $K_d$ ) は

5  $1.6 \pm 0.2 \mu\text{M}$  ( $n = 3$ ) であると推定された。この値は脳シナプトソームで報告されている数値と類似していた (J. Neurochem. 60, 1191-1201, 1993, Life Sci. 35, 2335-2343, 1984, Brain Res. 348, 321-330, 1985)。さらに、HC3、コリン(Cho)、アセチルコリン(Ach)による特異的  $[^3\text{H}] \text{HC3}$  結合の置換について検討した。アセチルコリンは  $1 \mu\text{M}$  フィゾスチグミン存在下で測定した。結果を図 17 に示す。図 17 から、 $[^3\text{H}] \text{HC3}$  の特異的結合はアセチルコリンよりも約 10 倍以上低い濃度で置換されることがわかる。これらの結果は CHT1 が高親和性コリントランスポーターであるだけでなく HC3 結合部位でもあることを示している。

15 本発明の配列番号 5 に記載されるヒト高親和性コリントランスポーターの cDNA は、例えば次のようにして調製することができる。線虫 (C. elegans) CHO-1 のアミノ酸配列でデータベース検索を行い、有意な相同性がある特定のヒトゲノム DNA 断片の配列 (human genomic survey sequence の 1 クローンである R-107P12; GenBank

20 accession number: AQ316435) を見出し、かかる DNA 断片の塩基配列を基に PCR の遺伝子特異的プライマーを設計した。ヒト全脳の Marathon-Ready™ cDNA (クローンテック社製) と付属のアダプタープライマーを用いて 5' - RACE (rapid amplification of cDNA ends) 及び 3' - RACE を行った。この得られた PCR 産物を PCR

25 用クローニングベクターにクローン化し、挿入 DNA の塩基配列を決定した。また、この DNA 配列から予想されるアミノ酸配列は配列番号 6

で示されている。かかる配列番号6で示されるヒト高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質は、配列番号5に示されるDNA配列情報に基づいて常法により作製することができる。

5 本発明の配列番号7に記載されるマウス高親和性コリントランスポーターのcDNAは、例えば次のようにして調製することができる。線虫（*C. elegans*）CHO-1のアミノ酸配列でデータベース検索を行い、有意な相同性がある特定のヒトゲノムDNA断片の配列（human genomic survey sequenceの1クローンであるR-107P12； GenBank accession number：AQ316435）を見出し、かかるDNA断片の塩基配列を基にPCRの遺伝子特異的プライマーを設計した。マウス全脳のMarathon-Ready™ cDNA（クローンテック社製）と付属のアダプタープライマーを用いて5'-RACE（rapid amplification of cDNA ends）及び3'-RACEを行った。この得られたPCR産物をPCR用クローニングベクターにクローン化し、挿入DNAの塩基配列を決定した。また、このDNA配列から予想されるアミノ酸配列は配列番号8で示されている。かかる配列番号8で示されるマウス高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質は、配列番号7に示されるDNA配列情報に基づいて常法により作製することができる。

20 本発明の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質としては、天然由来のタンパク質であっても組換えタンパク質であってもよく、上記具体的に開示した配列番号2、4、6及び8で示されるものの他に、配列番号2、4、6及び8で示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質も包含され、これらは公知の方法で調製することができる。また、  
25 本発明の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコ

ードする遺伝子又はDNAとしては、上記具体的に開示された配列番号  
1、3、5及び7で示されるものの他に、配列番号2、4、6及び8で  
示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置  
換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ高親和性コリントラ  
5   ンスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子又はDNAや、  
これら遺伝子又はDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズ  
し、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコ  
ードするDNAも包含され、これらは公知の方法で調製することができる。

- 10   ところで、コリン作動性神経は学習・記憶に非常に重要な役割を果た  
している。この神経の障害と痴呆の重篤さは相関する。アセチルコリン  
合成の律速段階は高親和性コリン取り込みであり、その活性は神経活動  
や種々の刺激で制御されている。さらにアルツハイマー病患者の脳では  
高親和性コリン取り込みやHC3結合活性が亢進している（Trends  
15   Neurosci. 15, 117-122, 1992、Ann. NY Acad. Sci. 777, 197-204, 1996、  
J. Neurochem. 69, 2441-2451, 1997）。上記高親和性コリントランスポ  
ーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子又はDNAや、高親  
和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質のクローニングは  
これらの制御の分子機構を明らかにしたり、アルツハイマー病の新しい  
20   療法を開発したりするために重要である。

本発明の融合タンパク質とは、線虫、ラット、ヒト、マウス等の高親  
和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質に、マーカートン  
パク質及び／又はペプチドタグとを結合させたものをいい、マーカート  
ンパク質としては、従来知られているマーカートンパク質であればどの  
25   ようなものでもよく、例えば、アルカリフォスファターゼ、抗体のFc  
領域、HRP、GFPなどを具体的に挙げることができ、また本発明に

おけるペプチドタグとしては、Mycタグ、Hisタグ、FLAGタグ、GSTタグなどの従来知られているペプチドタグを具体的に例示することができる。かかる融合タンパク質は、常法により作製することができ、Ni-NTAとHisタグの親和性を利用した高親和性コリントランス

5 ポーター活性を有するタンパク質の精製や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の検出や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質に対する抗体の定量、アルツハイマー症の診断用マーカーなどとして、また当該分野の研究用試薬としても有用である。

10 本発明の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質に特異的に結合する抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体等の免疫特異的な抗体を具体的に挙げることができ、これらは上記高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を抗原として用いて常法により作製することが

15 できるが、その中でもモノクローナル抗体がその特異性の点でより好ましい。かかるモノクローナル抗体等の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質に特異的に結合する抗体は、例えば、アルツハイマー症の診断や高親和性コリントランスポーターの制御の分子機構を明らかにする上で有用である。

20 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質に対する抗体は、慣用のプロトコルを用いて、動物（好ましくはヒト以外）に該高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質若しくはエピトープを含む断片、又は該タンパク質を膜表面に発現した細胞を投与することにより産生され、例えばモノクローナル抗体の調製には、連続細胞系の培養物により産生される抗体をもたらす、ハイブリドーマ法

25 (Nature 256, 495-497, 1975)、トリオーマ法、ヒトB細胞ハイブリド

ーマ法 (Immunology Today 4, 72, 1983) 及び E B V - ハイブリドーマ法 (MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp.77-96, Alan R.Liss, Inc., 1985) など任意の方法を用いることができる。

5 本発明の上記高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質に対する一本鎖抗体をつくるために、一本鎖抗体の調製法 (米国特許第 4,946,778 号) を適用することができる。また、ヒト化抗体を発現させるために、トランスジェニックマウス又は他の哺乳動物等を利用したり、上記抗体を用いて、その高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を発現するクローンを単離・同定したり、アフィニティークロマトグラフィーでそのポリペプチドを精製することもできる。高  
10 親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質に対する抗体は、とりわけ、アルツハイマー症等の診断や治療に使用できる可能性がある。

本発明はまた、上記高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞に関する。  
15 かかる高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子の宿主細胞への導入は、Davis ら (BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1986) 及び Sambrook ら (MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) などの多くの標準  
20 的な実験室マニュアルに記載される方法、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション(transvection)、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレーブローディング (scrape loading)、弾丸導入(ballistic  
25 introduction)、感染等により行うことができる。そして、宿主細胞としては、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌、ストレプトコッカス、スタ



5 フィロコッカス等の細菌原核細胞や、酵母、アスペルギルス等の真菌細胞や、ドロソフィラ S 2、スポドプテラ S f 9 等の昆虫細胞や、L 細胞、CHO 細胞、COS 細胞、HeLa 細胞、C 1 2 7 細胞、BALB/c 3 T 3 細胞（ジヒドロ葉酸レダクターゼやチミジンキナーゼなどを欠損した変異株を含む）、BHK 2 1 細胞、HEK 2 9 3 細胞、Bowes メラノーマ細胞等の動物細胞や、植物細胞等を挙げることができる。

また、発現系としては、上記高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を宿主細胞内で発現させることができる発現系であればどのようなものでもよく、染色体、エピソーム及びウイルスに由来する発現系、例えば、細菌プラスミド由来、酵母プラスミド由来、SV 4 0 のようなパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レトロウイルス由来のベクター、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来及びこれらの組合せに由来するベクター、例えば、コスミドやファージミドのようなプラスミドと  
10 バクテリオファージの遺伝的要素に由来するものを挙げることができる。この発現系は発現を起こさせるだけでなく発現を調節する制御配列を含んでいてもよい。

上記発現系を含んでなる宿主細胞やかかる細胞の細胞膜、またかかる細胞を培養して得られる高親和性コリントランスポーター活性を有する  
20 タンパク質は、後述するように本発明のスクリーニング方法に用いることができる。例えば、細胞膜を得る方法としては、F. Pietri-Rouxel (Eur. J. Biochem., 247, 1174-1179, 1997) らの方法などを用いることができ、また、かかる高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を細胞培養物から回収し精製するには、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、  
25 ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフ

ィー、アフィニティークロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含めた公知の方法、好ましくは、高速液体クロマトグラフィーが用いられる。特に、アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、例えば、抗

5 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質抗体を結合させたカラムや、上記高親和性コリントランスポーターに通常のペプチドタグを付加した場合は、このペプチドタグに親和性のある物質を結合したカラムを用いることにより、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を得ることができる。

- 10 本発明において、上記高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物とは、染色体上の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子の一部若しくは全部が破壊・欠損・置換等の遺伝子変異により不活性化され、高親和性コリントランスポーター活性を有
- 15 するタンパク質を発現する機能を失なった非ヒト動物をいい、また、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で過剰発現する非ヒト動物とは、野生型非ヒト動物に比べてかかる高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を大量に産生する非ヒト動物をいう。そして、本発明における非ヒト
- 20 動物としては、マウス、ラット等の齧歯目動物などの非ヒト動物を具体的に挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

ところで、メンデルの法則に従い出生してくるホモ接合体非ヒト動物には、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質欠損型又は過剰発現型とその同腹の野生型とが含まれ、これらホモ接合体非ヒト動物における欠損型又は過剰発現型とその同腹の野生型を同時に用い

25 ることによって個体レベルで正確な比較実験をすることができることか

ら、野生型の非ヒト動物、すなわち高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損又は過剰発現する非ヒト動物と同種の動物、さらには同腹の動物を、例えば下記に記載する本発明のスクリーニングに際して併用することが好ましい。

- 5   かかる高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損又は過剰発現する非ヒト動物の作製方法を、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質のノックアウトマウスやトランスジェニックマウスを例にとって以下説明する。
- 10   例えば、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損したマウス、すなわち高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質ノックアウトマウスは、マウス遺伝子ライブラリーからPCR等の方法により得られた遺伝子断片を用いて、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質
- 15   をコードする遺伝子をスクリーニングし、スクリーニングされた高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子をウイルスベクター等を用いてサブクローンし、DNAシーケンシングにより特定する。このクローンの高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子の全部又は一部をpMC1ネオ
- 20   遺伝子カセット等に置換し、3'末端側にジフテリアトキシンAフラグメント(DT-A)遺伝子や単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ(HSV-tk)遺伝子等の遺伝子を導入することによって、ターゲットベクターを作製する。

- この作製されたターゲティングベクターを線状化し、エレクトロポレ
- 25   ーション(電気穿孔)法等によってES細胞に導入し、相同的組換えを行い、その相同的組換え体の中から、G418やガンシクロピア(GA

- NC)等の抗生物質により相対的組換えを起こしたES細胞を選択する。また、この選択されたES細胞が目的とする組換え体かどうかをサザンブロット法等により確認することが好ましい。その確認されたES細胞のクローンをマウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションし、かかる
- 5 胚盤胞を仮親のマウスに戻し、キメラマウスを作製する。このキメラマウスを野生型のマウスとインタークロスさせると、ヘテロ接合体マウスを得ることができ、また、このヘテロ接合体マウスをインタークロスさせることによって、本発明の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質ノックアウトマウスを作製することができる。また、高
- 10 親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質ノックアウトマウスが生起しているかどうかを確認する方法としては、例えば、上記の方法により得られたマウスからRNAを単離してノーザンブロット法等により調べたり、またこのマウスの発現をウエスタンブロット法等により調べる方法がある。
- 15 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質のトランスジェニックマウスは、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードするcDNAにチキン $\beta$ -アクチン、マウスニューロフィラメント、SV40等のプロモーター、及びラビット $\beta$ -グロビン、SV40等のポリA又はイントロンを融合させて導入遺伝子を構築し、
- 20 該導入遺伝子をマウス受精卵の前核にマイクロインジェクションし、得られた卵細胞を培養した後、仮親のマウスの輸卵管に移植し、その後被移植動物を飼育し、産まれた仔マウスから前記cDNAを有する仔マウスを選択することによりかかるトランスジェニックマウスを創製することができる。また、cDNAを有する仔マウスの選択は、マウスの尻尾
- 25 等より粗DNAを抽出し、導入した高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子をプローブとするドットハイ

ブリダイゼーション法や、特異的プライマーを用いたPCR法等により行うことができる。

また、本発明の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子又はDNAの全部あるいは一部を用いると、アルツハイマー症等の遺伝子治療に有効な細胞を調製することができる。

5 本発明におけるこれら細胞の調製方法としては、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した細胞に、上記本発明の遺伝子又はDNAの全部あるいは一部をトランスフェクション等により導入し、高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞を得る方法を挙げることができ、特に、かかる高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞としては、上記遺伝子又はDNA等が染色体にインテグレートされ、ステイブルに高親和性コリントランスポーター活性を示す細胞を用いることが好ましい。

10

また、上記高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子若しくはDNA、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質とマーカータンパク質及び／又はペプチドタグとを結合させた融合タンパク質、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質に対する抗体、高親和性コリントランスポーター活性を有する

15

20

25

タンパク質を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞、高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞等を用いると、アルツハイマー症等のような症状の治療に有用な薬剤、すなわち高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質をスクリーニングすることができる。

本発明におけるスクリーニング方法としては、被検物質の存在下、上

記本発明の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の高親和性コリントランスポーター活性を測定・評価する方法や、被検物質の存在下、本発明の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を発現している細胞膜又は細胞をインビトロで培養し、該細胞

5 における高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性及び／又は発現量を測定・評価する方法や、前記高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損又は過剰発現する非ヒト動物及び／又は野生型非ヒト動物に被検物質を投与し、本発明の高親和性コリントランスポーター活性を有する

10 タンパク質の活性及び／又は発現量を測定・評価する方法等を挙げることができる。上記細胞膜又は細胞としては、前記高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損又は過剰発現する非ヒト動物又は野生型非ヒト動物などから得られる初代培養した細胞などの細胞や、本発明の高親和性コリントラン

15 スポーター活性を有するタンパク質を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞や、本発明の高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞や、これら細胞の細胞膜などを具体的に例示することができる。

上記被検物質と高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質とを用いたスクリーニング方法について、以下に具体的に例を挙げて説明するが、本発明のスクリーニング方法はこれらに限定されるものではない。高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質発現細胞を被検物質の存在下で培養し、一定時間培養後細胞膜表面に発現された高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が減少

20 又は増加したことを、本発明の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質に特異的に結合する抗体を用いて、E L I S A等によ

る免疫化学的に検出して、あるいはmRNAの発現が抑制又は促進したことを指標として評価することができる。また、かかるmRNAの検出法は、DNAチップ、ノーザンハイブリダイゼーション等の方法で行なうことができる他、高親和性コリントランスポーターをコードする遺伝子のプロモーターの下流にルシフェラーゼなどのレポーター遺伝子をつ

5    ないだ遺伝子を導入した細胞を用いると、被検物質による高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子の発現抑制又は促進は、前記レポーター遺伝子の活性を指標に検出することが可能である。

- 10    また本発明は、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性又は発現の促進を必要としている患者を治療するのに用いられる医薬組成物や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性又は発現の抑制を必要としている患者を治療するのに用い
- 15    られる医薬組成物であって、有効成分として高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性若しくは発現を促進する物質又は高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性若しくは発現を抑制する物質を含んでなる医薬組成物に関する。高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質は、多くの病理を含めて多数の生物
- 20    学的機能に関与していることから、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を刺激し得る化合物や、その機能を阻害し得る化合物は医薬としての用途が期待できる。

- 上記高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性若しくは発現を促進又は抑制する物質としては、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質に結合して、あるいは上流のシグナル伝達分子に作用して、単独で高親和性コリントランスポーター活性を
- 25

有するタンパク質の活性若しくは発現を促進する物質又はその活性若しくは発現を阻害・拮抗する物質であればどのようなものでもよく、例えば、抗体、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質のリガンド、このタンパク質の断片及び断片をコードするオリゴヌクレオチド等を具体的に挙げることができ、またこれらはアルツハイマー疾等  
5 のような症状の治療及び予防目的等の医薬として使用することができるが、これらの用途に限定されるものではない。

本発明はまた、検体中の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードするDNA配列を、本発明の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードするDNA配列と比較することからなる、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性又は発現と関連する疾病の診断方法に関する。高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードするDNAの変異型の検出は、遺伝子に変異がある個体をDNAレベルで見い出すことにより行うことができ、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の過少発現、過剰発現又は変異発現により生ずる疾病の診断に有効である。かかる検出に用いられる検体としては、被験者の細胞、例えば血液、尿、唾液、組織等の生検から得ることができるゲノムDNAや、RNA又はcDNAを具体的に挙げることができるがこれらに限定  
15 されるものではなく、かかる検体を使用する場合、PCR等により増幅したものをを用いてもよい。そして、塩基配列の欠失や挿入変異は、正常な遺伝子型と比較したときの増幅産物のサイズの変化により検出でき、また点突然変異は増幅DNAを標識高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子とハイブリダイズさせることで同定することができる。このように、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子の変異を検出することで、  
20 25



アルツハイマー疾等のような症状の診断又は判定をすることができる。

- 本発明はまた、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部からなるアルツハイマー症等のような症状の疾患の診断用プローブ、及び
- 5 当該プローブ及び／又は本発明の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質に特異的に結合する抗体を含有してなるアルツハイマー疾等のような症状の疾患の診断薬に関する。前記診断用プローブとしては、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードするDNA (cDNA) 又はRNA (cRNA) のアンチセンス鎖
- 10 の全部又は一部であり、プローブとして成立する程度の長さ (少なくとも20ベース以上) を有するものであれば特に制限されるものではない。かかるプローブ及び／又は本発明の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質に特異的に結合する抗体をアルツハイマー症等のような症状の診断薬の有効成分とするためには、プローブが分解されないような適当なバッファー類や滅菌水に溶解することが好ましい。また、
- 15 これらの診断薬を用いた、免疫染色法 (Dev. Biol. 170, 207-222, 1995, J. Neurobiol. 29, 1-17, 1996) や、In situ ハイブリダイゼーション法 (J. Neurobiol. 29, 1-17, 1996) や、in situ PCR 法等の方法によりアルツハイマー症等のような症状の疾患を診断することもできる。
- 20 以下上記の各種実験における実験方法等をさらに詳細に説明する。

(高親和性コリントランスポーターcDNAのクローニング)

- 線虫高親和性コリントランスポーターの候補のcDNAは、種々の発生段階の線虫混合物の poly(A)+RNA から逆転写PCR及び3' RACE
- 25 で単離した。プロトコールに従って Marathon<sup>TM</sup> cDNA Amplification Kit (クローンテック社製) を用いた。PCRの順方向のプライマーはC.

e l e g a n s ゲノム・プロジェクトから入手したDNA塩基配列に基  
いて、予測遺伝子の暫定的な翻訳開始点で設計した。増幅されたPCR  
産物を改変 pSPUTK ベクター（ストラタジーン社製）のNcoI（平  
滑化）部位とNotI部位にサブクローニングし、挿入DNAの塩基配  
5 列を決定した。ラットのCHT1 cDNAは GeneTrapper cDNA  
Positive Selection System（ギブコバイオラッドラボレトリー：GIBCO  
BRL）をプロトコール通りに使用してラット脊髄cDNAライブラリー  
から単離した。用いたプライマーは縮重PCRで得られたcDNA断片  
の塩基配列から設計した。得られたcDNAクローンを解析した結果陽  
10 性だったクローンをpSPUTKベクター及びpcDNA3.1+ ベクター（イン  
ビトロジェン社製）にサブクローニングした。

（アフリカツメガエル卵母細胞での発現）

cRNAはキャップアナログ存在下でSP6またはT7RNAポリメ  
15 ラーゼを用いてインビトロで合成した。キャップ化RNA 20-30 ng  
をアフリカツメガエル卵母細胞（ステージV-VI）に微量注入した。  
取り込み測定は文献（Nature 360, 467-471, 1992）に述べられている方  
法と本質的に同様に行った。コリン取り込みはRNA注入の2-3日後  
に0.75 mlの標準液中（0.01-1  $\mu$ Mの $[^3\text{H}]$ -コリン、1  
20 00 mMのNaCl、2 mMのKCl、1 mMのMgCl<sub>2</sub>、1 mMの  
CaCl<sub>2</sub>、10 mMのHEPES、5 mMのTris：pH 7.4）の  
卵母細胞（6-8個）を用いて30-60分間行った。取り込み後の卵  
母細胞は10%のSDSで可溶化して、液体シンチレーションカウンタ  
ーで $[^3\text{H}]$ 量を測定した。

25

（GFC発現コンストラクト）

cho-1::gfp の転写融合コンストラクトは文献 (Gene 212, 127-135, 1998) で述べられている方法と同様に P C R で作製した。核移行シグナル配列 (N L S) の下流にあるグリーン蛍光タンパク質 (G F P) をコードする遺伝子を c h o - 1 翻訳開始点からアミノ酸 3 残基分下流の位置に読み枠が合うように挿入した。N L S と g f p 遺伝子は pPD104.53  
5 ベクターから増幅した。c h o - 1 翻訳開始点から 5 . 1 k b 上流領域を調製するために c h o - 1 の最初のアミノ酸 3 残基分を含むように設計した P C R プライマーを用いた。文献 (EMBO J. 10, 3959-3970, 1991) で述べられている方法と同様に r o l - 6 (s u 1 0 0 6) マー  
10 カーと作製した D N A を線虫の生殖器官に同時注入した。

#### (ノザン解析)

ラットのさまざまな組織から調製した 6  $\mu$  g の poly(A)+RNA をホルムアルデヒド-アガロース電気泳動で分離し、ナイロン膜に転写した。次にハイブリダイゼーション溶液 (最終濃度で 5 0 % のホルムアミド、5  
15  $\times$  S S P E、5  $\times$  Denhardt's solution、0 . 5 % の S D S、1 0 0  $\mu$  g / m l の salmon sperm DNA を含む溶液) 中で、ランダム・プライム法で [ $^{32}$ P] ラベルした C H T 1 の c D N A 断片に対して 4 2  $^{\circ}$ C で 1 6 時間ハイブリダイズさせた。ナイロン膜は最終条件 (0 . 1  $\times$  S S P E、  
20 0 . 1 % の S D S : 6 5  $^{\circ}$ C) で洗浄後、エンハンシングスクリーン (enhancing screen) と共に 7 日間オートラジオグラフィーを行った。

#### (in situ ハイブリダイゼーション)

ジゴキシゲニンでラベルしたアンチセンスの転写産物は in vitro で合成した。転写産物は平均長 2 0 0 ~ 4 0 0 塩基対になるまでアルカリ分解を行った。新鮮凍結組織のクリオスタット切片 (1 0 ~ 2 0  $\mu$  m) を  
25

用いた。ハイブリダイゼーションは  $1\times$ Denhardt's 溶液 [最終濃度で 5  
0 mM の T r i s - H C l (pH 8. 0)、2. 5 mM の E D T A、0.  
3 M の N a C l、5 0 % のホルムアミド、1 0 % のデキストランサルフ  
エート、1 m g / m l の大腸菌 (E. coli) の t R N A を含む溶液] に溶  
5 解させたラベル化 c R N A プロブ (およそ  $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) で  $45^{\circ}\text{C}$  で  
2 0 時間行った。次に切片を  $2\times$ S S C / 5 0 % のホルムアミド中で 2  
回、 $1\times$ S S C / 5 0 % のホルムアミド中で 1 回、いずれも  $45^{\circ}\text{C}$  で洗  
浄した。ハイブリダイズしたプロブを抗ジゴキシゲニン F a b 断片  
(Boehringer-Mannheim) と N B T / B C I P 基質を用いて可視化した。  
10 切片は基質溶液中で 2 4 - 4 8 時間反応させた。

#### (結合実験)

[ $^3\text{H}$ ] ヘミコリニウム-3 (H C 3 ;  $128\text{Ci}/\text{mmol}$ ) は N E N  
Life Science Products から入手した。pcDNA3.1-CHT1 あるいは  
15 pcDNA3.1 をそれぞれ C O S 7 細胞に一過性に発現させた。プロトコー  
ルに従って TransFast Reagent (プロメガ社製) を導入し用いた。膜調  
製は、細胞を 0. 3 2 M スクロース中でホモジュナイズし、2 0 0 , 0  
0 0 g で 1 時間遠心後、沈澱物を懸濁させた。結合実験は他で述べられ  
ている方法と本質的に同様に行った。特異的結合量は  $10\ \mu\text{M}$  の H C 3  
20 存在下で決定した非特異的結合量を全体の結合量から差し引いて計算し  
た。飽和結合実験のデータから特異的な [ $^3\text{H}$ ] H C 3 結合量を非線形  
近似で解析して K d 値を算出した。

#### 産業上の利用可能性

25 本発明によると、生理的に重要である高親和性コリントランスポータ  
ー活性を有するタンパク質、それをコードする遺伝子 D N A を提供する

ことができる。また、それらタンパク質や遺伝子DNAを用いることにより、アルツハイマー症の予防や治療に有用な物質をスクリーニングすることや、遺伝子治療に有用な細胞を調製することができる。

## 請 求 の 範 囲

1. 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。
- 5 2. 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子。  
(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質  
(b)配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質
- 10 3. 配列番号1に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むDNA。  
4. 請求項3記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする線虫由来のDNA。
- 15 5. 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子。  
(a)配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質  
(b)配列番号4に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質
- 20 6. 配列番号3に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むDNA。  
7. 請求項6記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードするラット由来のDNA。
- 25 8. 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子。  
(a)配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号6に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質

9. 配列番号5に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むDNA。

10. 請求項9記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードするヒト由来のDNA。

11. 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子。

10 (a)配列番号8に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号8に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質

12. 配列番号7に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むDNA。

13. 請求項12記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードするマウス由来のDNA。

14. 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質。

20 15. 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

16. 配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ線虫高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質。

17. 配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

25 18. 配列番号4に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、か

ットラット高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質。

19. 配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

20. 配列番号6に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、か

5 ットヒト高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質。

21. 配列番号8に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

22. 配列番号8に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつマウス高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質。

10 23. 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質と、マーカータンパク質及び／又はペプチドタグとを結合させた融合タンパク質。

24. 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項15又は16記載の線虫高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項23記載の融合タンパク質。

25 25. 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項17又は18記載のラット高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項23記載の融合タンパク質。

26. 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項19又は20記載のヒト高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項23記載の融合タンパク質。

27. 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項21又は22記載のマウス高親和性コリントランスポーター活性



を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 2 3 記載の融合タンパク質。

28. 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質に特異的に結合する抗体。

- 5 29. 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 1 5 又は 1 6 記載の線虫高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 2 8 記載の抗体。

30. 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 1 7 又は 1 8 記載のラット高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 2 8 記載の抗体。  
10

31. 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 1 9 又は 2 0 記載のヒト高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 2 8 記載の抗体。

32. 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 2 1 又は 2 2 記載のマウス高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 2 8 記載の抗体。  
15

33. 抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 2 8 ～ 3 2 のいずれか記載の抗体。

34. 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞。  
20

35. 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 1 5 又は 1 6 記載の線虫高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 3 4 記載の宿主細胞。

36. 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 1 7 又は 1 8 記載のラット高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 3 4 記載の宿主細胞。  
25

37. 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項19又は20記載のヒト高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項34記載の宿主細胞。
38. 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、
- 5 請求項21又は22記載のマウス高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項34記載の宿主細胞。
39. 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損又は過剰発現することを特徴とする非ヒト動物。
- 10 40. 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項15又は16記載の線虫高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項39記載の非ヒト動物。
41. 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、
- 15 請求項17又は18記載のラット高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項39記載の非ヒト動物。
42. 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項19又は20記載のヒト高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項39記載の非ヒト動物。
- 20 43. 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項21又は22記載のマウス高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項39記載の非ヒト動物。
44. 非ヒト動物が、マウス又はラットであることを特徴とする請求
- 25 項39～43のいずれか記載の非ヒト動物。
45. 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコ

ードする遺伝子機能が染色体上で欠損した細胞に、請求項 8 ～ 10 のいずれか記載の遺伝子又は DNA を導入することを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞の調製方法。

46. 高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞が、請求項 5 8 ～ 10 のいずれか記載の遺伝子又は DNA が染色体にインテグレートされ、ステイブルに高親和性コリントランスポーター活性を示す細胞であることを特徴とする請求項 45 記載の高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞の調製方法。

47. 請求項 45 又は 46 記載の高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞の調製方法により得られることを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞。

48. 被検物質の存在下、請求項 14 ～ 22 のいずれか記載の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の高親和性コリントランスポーター活性を測定・評価することを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法。

49. 被検物質の存在下、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を発現している細胞膜又は細胞をインビトロで培養し、該細胞膜又は該細胞における高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性及び／又は発現量を測定・評価することを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法。

50. 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を発現している細胞膜又は細胞が、請求項 34 ～ 38 のいずれか記載の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞又は請求項 47 記載の高親和性コリ

ントランスポーター活性を有する細胞であることを特徴とする請求項 4  
9 記載の高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又  
は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質のスクリー  
ーニング方法。

5 5 1. 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、  
組換えタンパク質であることを特徴とする請求項 4 8 ～ 5 0 のいずれか  
記載の高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は  
高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質のスクリー  
ーニング方法。

10 5 2. 被検物質の存在下、請求項 3 9 ～ 4 4 のいずれか記載の非ヒト  
動物から得られた細胞をインビトロで培養し、該細胞における高親和性  
コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性及び／又は発現  
量を測定・評価することを特徴とする高親和性コリントランスポーター  
活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促  
15 進若しくは抑制物質のスクリーニング方法。

5 3. 被検物質を非ヒト動物に投与し、高親和性コリントランスポー  
ター活性を有するタンパク質の活性及び／又は発現量を評価することを  
特徴とする高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質  
又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質のスク  
20 リーニング方法。

5 4. 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコ  
ードする遺伝子機能が染色体上で欠損又は過剰発現した非ヒト動物に被  
検物質を投与し、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパ  
ク質の活性及び／又は発現量を評価することを特徴とする高親和性コリ  
25 ントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントラ  
ンスポーター発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法。

5 5. 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損又は過剰発現した非ヒト動物に被検物質を投与し、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性及び／又は発現量を野生型非ヒト動物の場合と比較・評価することを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法。

10 5 6. 非ヒト動物が、マウス又はラットであることを特徴とする請求項 5 2～5 5 のいずれか記載の高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法。

5 7. 請求項 4 8～5 6 のいずれか記載のスクリーニング方法により得られる高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性若しくは発現を促進する物質。

15 5 8. 請求項 4 8～5 6 のいずれか記載のスクリーニング方法により得られる高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性若しくは発現を抑制する物質。

20 5 9. 高親和性コリントランスポーターの活性増加又は発現増強を必要としている患者を治療するのに用いられる医薬組成物であって、有効成分として請求項 1 4～2 2 のいずれか記載のタンパク質及び／又は請求項 5 7 記載の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性若しくは発現を促進する物質を含んでなる医薬組成物。

25 6 0. 高親和性コリントランスポーターの活性又は発現の抑制を必要としている患者を治療するのに用いられる医薬組成物であって、有効成分として請求項 1 4～2 2 のいずれか記載のタンパク質及び／又は請求項 5 8 記載の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質

の活性若しくは発現を抑制する物質を含んでなる医薬組成物。

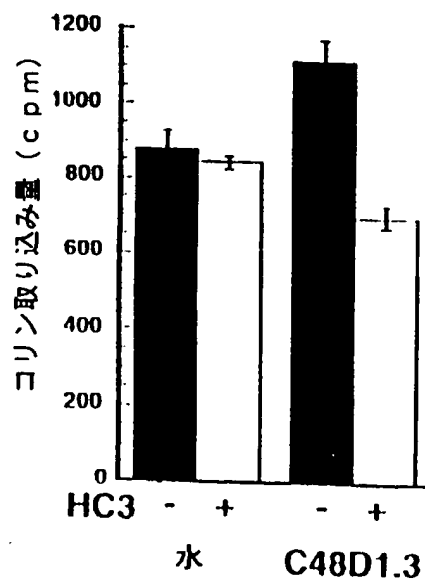
61. 検体中の高親和性コリントランスポーターをコードするDNA配列を、請求項19又は20記載のタンパク質をコードするDNA配列と比較することを特徴とする高親和性コリントランスポーターの発現又

5 は活性と関連する疾病の診断方法。

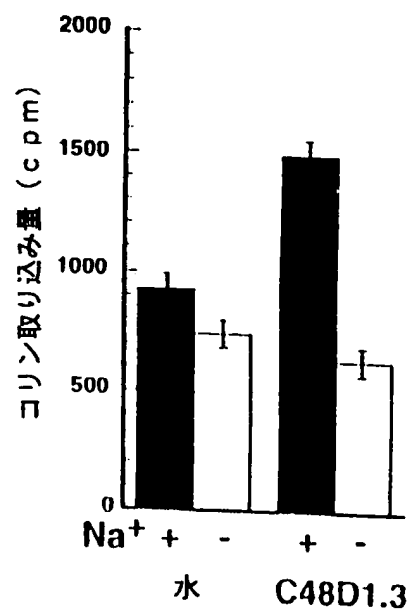
62. 請求項19又は20記載のタンパク質をコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部からなるアルツハイマー症の診断用プローブ。

63. 請求項62記載の診断用プローブ及び／又は請求項28～33  
10 のいずれか記載の抗体を含有することを特徴とするアルツハイマー症の診断薬。

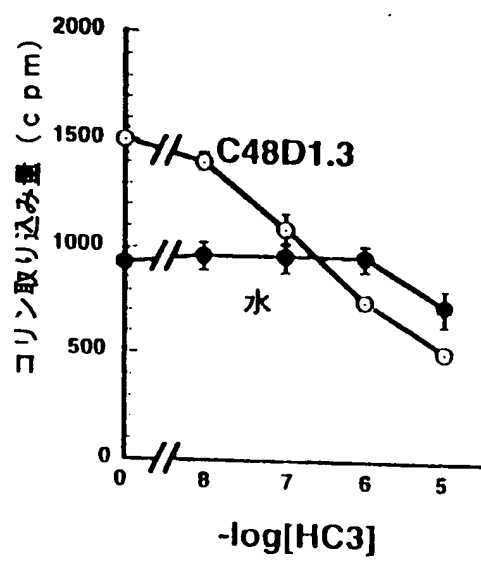
第 1 図



第 2 図



第 3 図

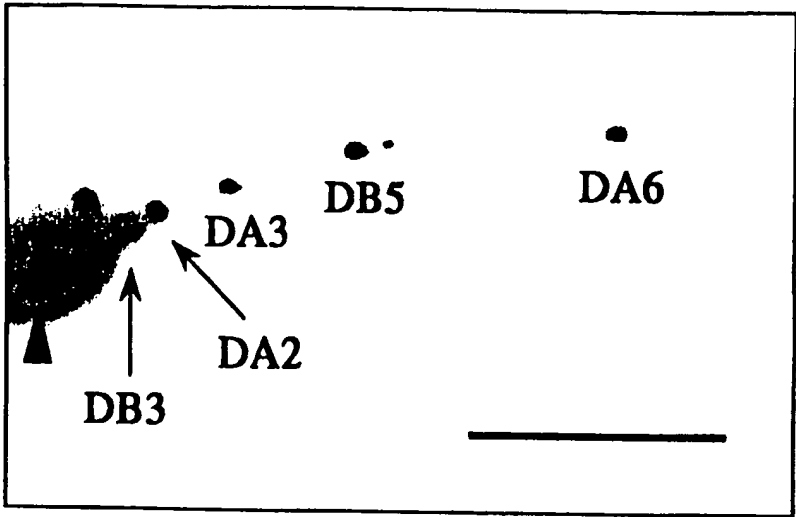




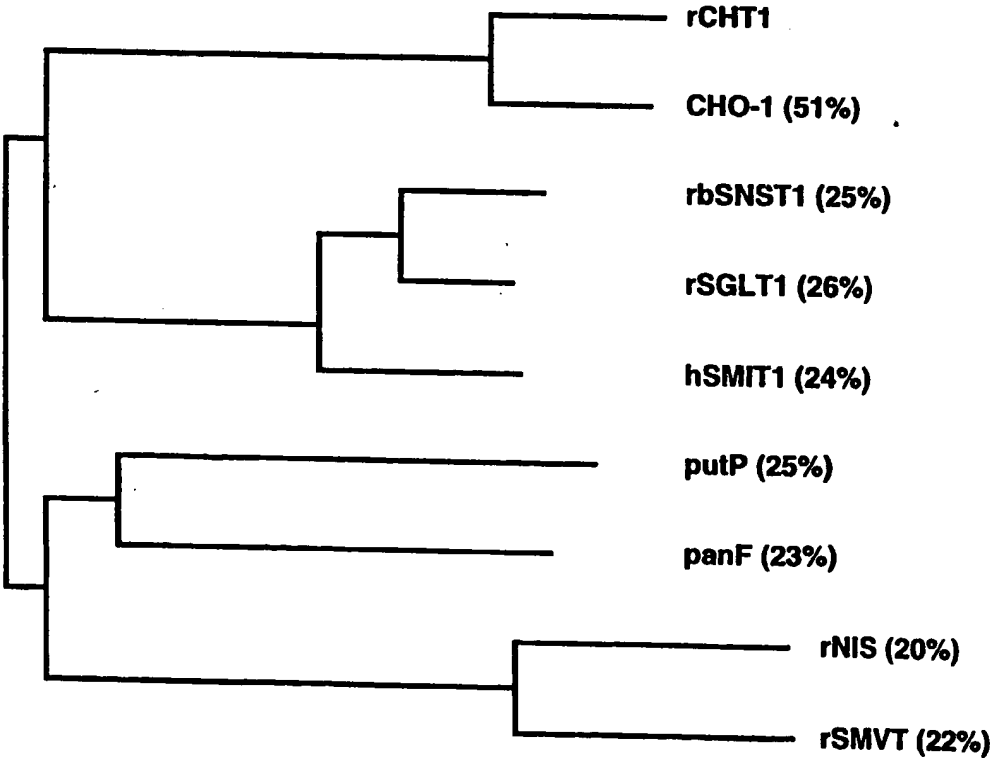
## 第 4 図

CHT1	MPFHVEGLVAITTFYELTFLVGIWAANKTKNS----GNAEERSEATVGGRTGLLVGGF	56
cht-1	-MADLLGIVAIVFFYMLILVVGIIWGRKSKSSKELESEAGAATIEVMLAGRIGTLVGIF	59
I		
CHT1	TMTATWVGGGYINGTAEAVYGPCCGLAWAQAPIGYSLILGGLFFAKPMRSKGYVTMLD	116
cht-1	TMTATWVGGAINGTAEALYNG--GLLGCAQAPVGYAISLVMGGLLFAKMMREEGYITMLD	117
II		
CHT1	PFOQIYGRMGGLLFIPALMGFWAAATFSALGATISVIIIDVDNISVIIVSALIAILYT	176
cht-1	PFOHKYGRIGGLMYVPALLGETFWTAAILSALGATLSVILGIDMNASVTLSACIAVFYT	177
III		
CHT1	LVGGLYSVAYTDVVQLFCIFIGLWISVPFALSHPVVTDIGFTAMIAKYQSPWLGTTIES-V	235
cht-1	FTGGYYAVAYTDVVQLFCIFVGLWVCVPAAMVHDGAKDISRNAG-----DWIGEIGGFK	231
IV		
CHT1	EVYTWLDNFLLLMLGGIPWQAYFORVLSSSSATYAQVLSFLAAFGLVMALPAICIGATG	295
cht-1	ETSLWIDCMLLLVFGGIPWQVYFORVLSKTAHGAOTLSFVAGVGCILMAIPALIGATA	291
V		
CHT1	ASTDWNQIAYGFDPDKTKEEAD-----MILPTVLQYLCPVYISFFGLGAVSAAVMSSAD	349
cht-1	RNTDWRMTDYSPWNGTKVESIPDKRNMVPLVFOYLTFRWVAFIIGLGAUSAAMSSAD	351
VI		
CHT1	SSILSASSMFARNTIYQLSFRQNASDKEIVVMRIITVFVFGASATAMALLTKTVYGLWYLS	409
cht-1	SSVLSAASMFAHNIWKLTIIRPHASEKEVIIVMRIAIIICVGIMATIMALTIQSIYGLWYLC	411
VII		
CHT1	SDLVYIIIFPQLLCVLFIKGTNTYGAVAGYIFGLFLRITGGEPYLYLQPLIFYPGYPPDK	469
cht-1	ADLVYVILFPQLLCVVMYMPRSNTYGSLAGYAVGLVRLIGGEPLVSLPAFFHYPMYT-D	469
VIII		
CHT1	NGIYNQRFPFKILSMVTISFFTNICVSYLAKYLFESGTLPPKLDIFDAVVS---HSEENM	526
cht-1	G---VQYFPFRITAMLSMATIYIVSIQSEKLFKSGRLSPEWDMGCVVNIPIDNVPLPS	526
IX		
CHT1	DKTILVRNENIKLNELAPVKPRQSLTSSFTNKEALLDVS--SPEGSGTEDNLQ	580
cht-1	DVSFAVSSE--TLNMKAPNGTPAPVHPNQPSDENTLLHPYSDQSYYSN--	576
X		
XI		
XII		

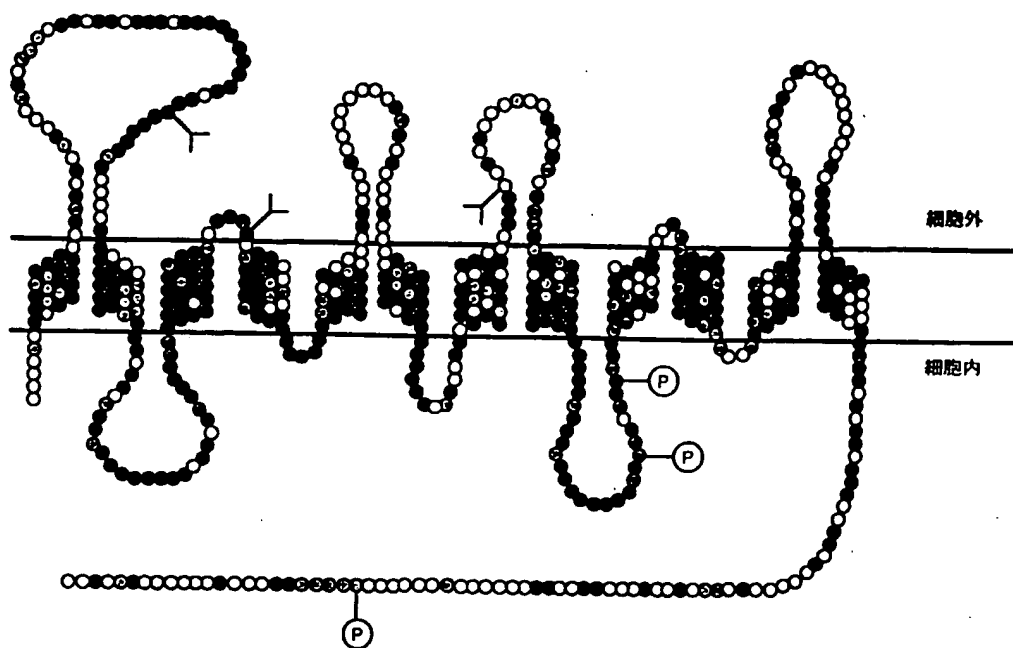
第 5 図



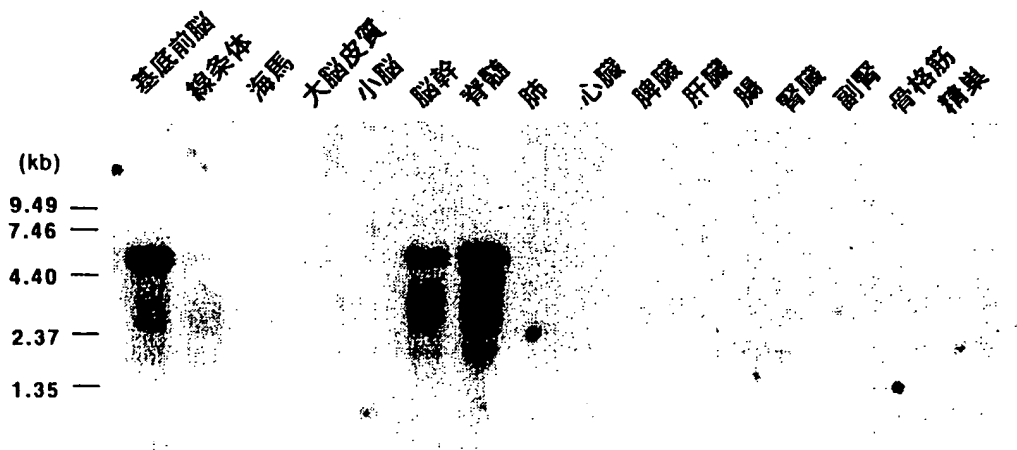
第 6 図



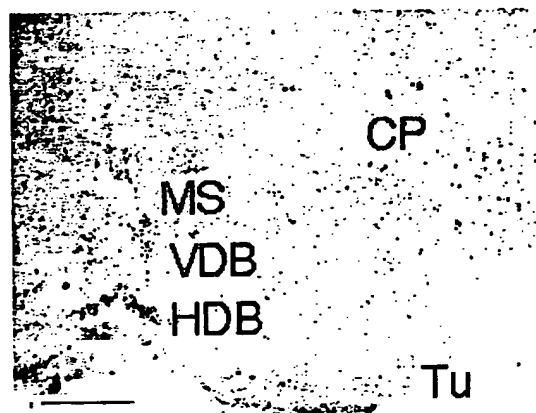
第 7 図



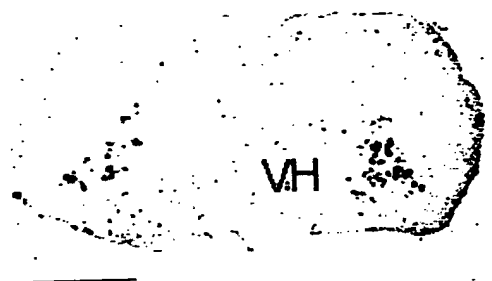
第 8 図



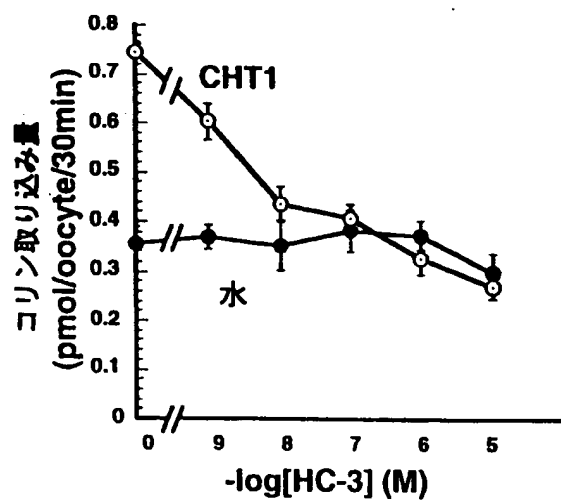
第 9 図



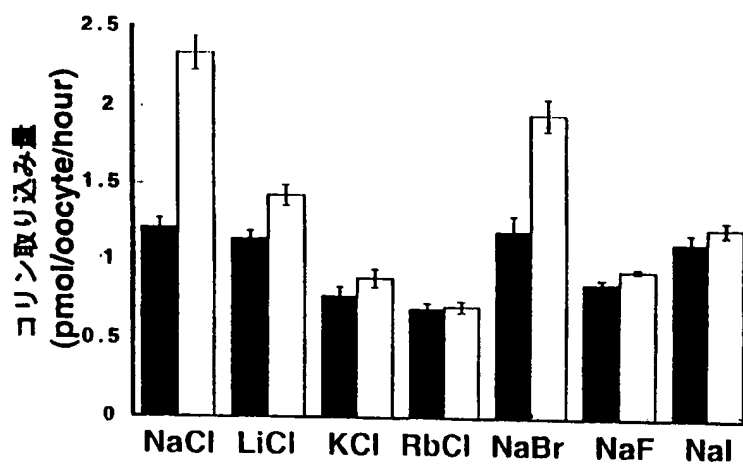
第 10 図



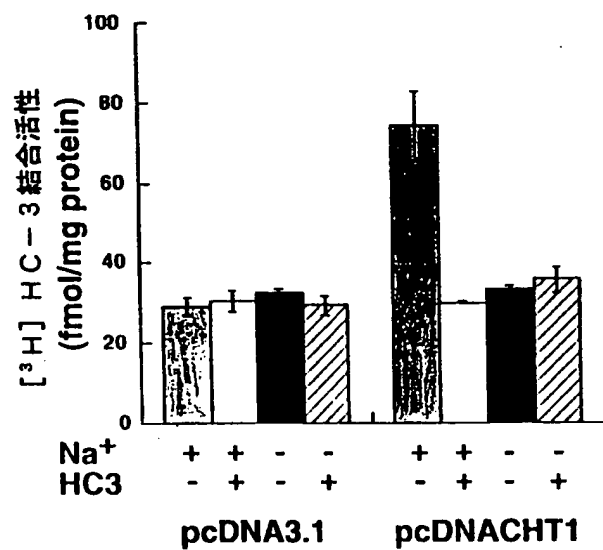
第 13 図



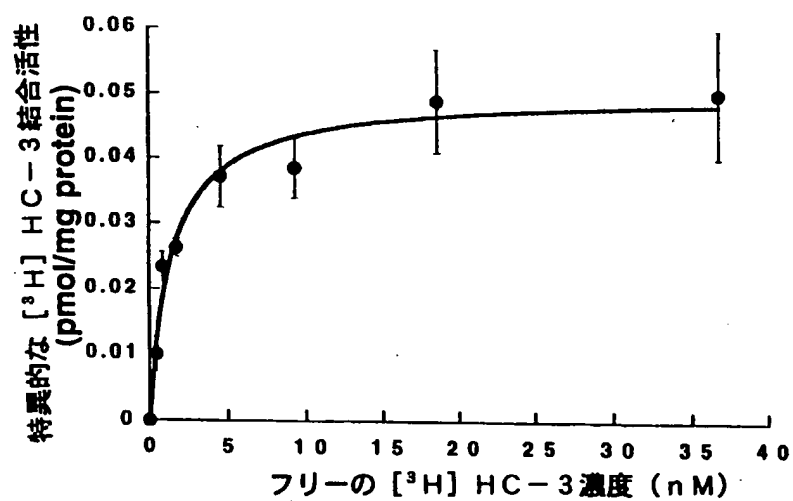
第 14 図



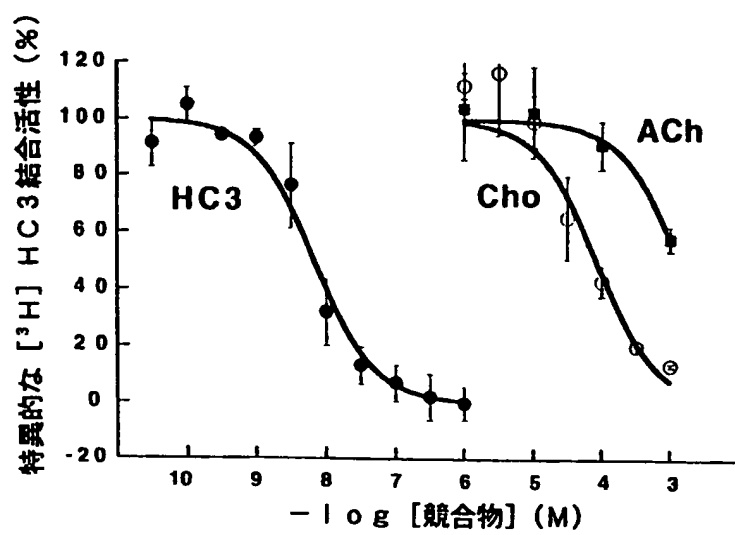
第 15 図



第 16 図



第 17 図



## SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION

<120> High-Affinity Choline Transporter

<130> A011-05PCT

<140>

<141>

<150> JP 11/240642

<151> 1999-08-27

<150> JP 11/368991

<151> 1999-12-27

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1731

<212> DNA

<213> Caenorhabditis elegans

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1731)

<400> 1

atg gcc gac tta ttg ggt atc gtg gcc att gtg ttc ttc tac gtg ctc 48

Met Ala Asp Leu Leu Gly Ile Val Ala Ile Val Phe Phe Tyr Val Leu

1

5

10

15



att ctt gtc gtt gga ata tgg gcg ggt aga aaa tcg aaa agt tca aaa	96
Ile Leu Val Val Gly Ile Trp Ala Gly Arg Lys Ser Lys Ser Ser Lys	
20 25 30	
gag ctt gaa tca gaa gcc ggc gcg gcg acg gaa gag gtg atg tta gct	144
Glu Leu Glu Ser Glu Ala Gly Ala Ala Thr Glu Glu Val Met Leu Ala	
35 40 45	
ggg aga aac atc gga act ctt gtc gga att ttc aca atg act gcc acg	192
Gly Arg Asn Ile Gly Thr Leu Val Gly Ile Phe Thr Met Thr Ala Thr	
50 55 60	
tgg gtt ggc ggt gct tat atc aat gga acc gcc gag gct ctg tat aat	240
Trp Val Gly Gly Ala Tyr Ile Asn Gly Thr Ala Glu Ala Leu Tyr Asn	
65 70 75 80	
gga ggt ctc ctt gga tgt cag gct cca gtt gga tat gca att tcc ctt	288
Gly Gly Leu Leu Gly Cys Gln Ala Pro Val Gly Tyr Ala Ile Ser Leu	
85 90 95	
glt atg gga gga cta ctt ttc gca aag aaa atg cga gaa gaa gga tat	336
Val Met Gly Gly Leu Leu Phe Ala Lys Lys Met Arg Glu Glu Gly Tyr	
100 105 110	
att aca atg ctc gat cct ttt cag cac aaa tat ggc caa cga atc ggt	384
Ile Thr Met Leu Asp Pro Phe Gln His Lys Tyr Gly Gln Arg Ile Gly	
115 120 125	
ggc ttg atg tat gtt cca gca ctt ctt ggt gaa aca ttc tgg aca gca	432
Gly Leu Met Tyr Val Pro Ala Leu Leu Gly Glu Thr Phe Trp Thr Ala	
130 135 140	
gcc att ctt tcg gca ctt ggt gca aca ctg tcg gta att ctt gga atc	480
Ala Ile Leu Ser Ala Leu Gly Ala Thr Leu Ser Val Ile Leu Gly Ile	
145 150 155 160	

gac atg aat gca lca gtc acc ctg tgc gcc tgt att gcc gla ttc tac 528  
 Asp Met Asn Ala Ser Val Thr Leu Ser Ala Cys Ile Ala Val Phe Tyr

165

170

175

aca ttc acc ggt gga tac tat gca glc gcg tac act gac glc gtt caa 576  
 Thr Phe Thr Gly Gly Tyr Tyr Ala Val Ala Tyr Thr Asp Val Val Gln

180

185

190

cta ttt tgc att ttc glc ggt ttg tgg gtt tgc gtg ccg gcg gct atg 624  
 Leu Phe Cys Ile Phe Val Gly Leu Trp Val Cys Val Pro Ala Ala Met

195

200

205

gtg cat gat ggt gcg aag gat att tcc agg aat gca ggc gac tgg att 672  
 Val His Asp Gly Ala Lys Asp Ile Ser Arg Asn Ala Gly Asp Trp Ile

210

215

220

gga gag att gga gga ttc aaa gaa aca tct ctc tgg att gat tgc atg 720  
 Gly Glu Ile Gly Gly Phe Lys Glu Thr Ser Leu Trp Ile Asp Cys Met

225

230

235

240

ctt ctc ctt gtc ttt gga gga att cca tgg caa gtg tac ttc caa aga 768  
 Leu Leu Leu Val Phe Gly Gly Ile Pro Trp Gln Val Tyr Phe Gln Arg

245

250

255

gtt ctc tcc tca aaa act gct cat gga gca cag acg ttg tgc ttt gtg 816  
 Val Leu Ser Ser Lys Thr Ala His Gly Ala Gln Thr Leu Ser Phe Val

260

265

270

gcg ggc gtc gga tgc att ctc atg gcg att cca cca gcg ttg atc ggt 864  
 Ala Gly Val Gly Cys Ile Leu Met Ala Ile Pro Pro Ala Leu Ile Gly

275

280

285

gca att gcc agg aac aca gac tgg aga atg act gat tat tcc cca tgg 912  
 Ala Ile Ala Arg Asn Thr Asp Trp Arg Met Thr Asp Tyr Ser Pro Trp

290	295	300	
aac aat gga act aag gtc gaa tgc att cca ccg gat aag aga aac atg	960		
Asn Asn Gly Thr Lys Val Glu Ser Ile Pro Pro Asp Lys Arg Asn Met			
305	310	315	320
gig gtc ccg tlg gta ttc cag tat ctt acg cca aga tgg gtc gcc ttt	1008		
Val Val Pro Leu Val Phe Gln Tyr Leu Thr Pro Arg Trp Val Ala Phe			
325	330	335	
att gga ctc ggc gca gig tgc gct gct gta atg tca tct gca gat tca	1056		
Ile Gly Leu Gly Ala Val Ser Ala Ala Val Met Ser Ser Ala Asp Ser			
340	345	350	
tct gta cta tca gca gca tca atg ttt gct cac aac atc tgg aag ctc	1104		
Ser Val Leu Ser Ala Ala Ser Met Phe Ala His Asn Ile Trp Lys Leu			
355	360	365	
aca att cgc cct cac gcg tct gaa aaa gaa gtg ata att gtg atg aga	1152		
Thr Ile Arg Pro His Ala Ser Glu Lys Glu Val Ile Ile Val Met Arg			
370	375	380	
ata gcc atc atc tgt gtt ggt atc atg gca acc atc atg gca ctt acc	1200		
Ile Ala Ile Ile Cys Val Gly Ile Met Ala Thr Ile Met Ala Leu Thr			
385	390	395	400
att caa tcc atc tat ggg ctt tgg tat ctt tgt gca gat ttg gtc tac	1248		
Ile Gln Ser Ile Tyr Gly Leu Trp Tyr Leu Cys Ala Asp Leu Val Tyr			
405	410	415	
gtc ata ctc ttc cct caa cta tta tgt gtt gla tat atg cca cgt agc	1296		
Val Ile Leu Phe Pro Gln Leu Leu Cys Val Val Tyr Met Pro Arg Ser			
420	425	430	
aat acg tat ggc tca ttg gct ggc tat gca gtc ggt ctt gtg ctc cgt	1344		

Asn Thr Tyr Gly Ser Leu Ala Gly Tyr Ala Val Gly Leu Val Leu Arg	
435 440 445	
ttg att gga ggc gag cca ctt gla tgc ctc cca gcg ttc ttc cat tat	1392
Leu Ile Gly Gly Glu Pro Leu Val Ser Leu Pro Ala Phe Phe His Tyr	
450 455 460	
cca atg tat acg gat ggg gla cag tat ttc cca ttc agg aca act gct	1440
Pro Met Tyr Thr Asp Gly Val Gln Tyr Phe Pro Phe Arg Thr Thr Ala	
465 470 475 480	
atg tta tct tca atg gct act atc tac att gla tca ata caa tgc gag	1488
Met Leu Ser Ser Met Ala Thr Ile Tyr Ile Val Ser Ile Gln Ser Glu	
485 490 495	
aag ctg ttc aaa tgc gga cgt ttg tct ccg gag tgg gac gla atg ggt	1536
Lys Leu Phe Lys Ser Gly Arg Leu Ser Pro Glu Trp Asp Val Met Gly	
500 505 510	
tgt gla gtg aat att ccg ata gat cat gla ccc ctt ccg tca gat gla	1584
Cys Val Val Asn Ile Pro Ile Asp His Val Pro Leu Pro Ser Asp Val	
515 520 525	
tcg ttt gct gtt agt agt gag acc ttg aat atg aag gct cca aac gga	1632
Ser Phe Ala Val Ser Ser Glu Thr Leu Asn Met Lys Ala Pro Asn Gly	
530 535 540	
aca ccg gct cca gla cat ccg aac caa cag ccg tct gat gaa aat aca	1680
Thr Pro Ala Pro Val His Pro Asn Gln Gln Pro Ser Asp Glu Asn Thr	
545 550 555 560	
tta tta cat cca tat tgc gac caa agt tat tat tcc aca aat agc aat	1728
Leu Leu His Pro Tyr Ser Asp Gln Ser Tyr Tyr Ser Thr Asn Ser Asn	
565 570 575	

taa

1731

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 576

&lt;212&gt; PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

&lt;400&gt; 2

Met Ala Asp Leu Leu Gly Ile Val Ala Ile Val Phe Phe Tyr Val Leu

1 5 10 15

Ile Leu Val Val Gly Ile Trp Ala Gly Arg Lys Ser Lys Ser Ser Lys

20 25 30

Glu Leu Glu Ser Glu Ala Gly Ala Ala Thr Glu Glu Val Met Leu Ala

35 40 45

Gly Arg Asn Ile Gly Thr Leu Val Gly Ile Phe Thr Met Thr Ala Thr

50 55 60

Trp Val Gly Gly Ala Tyr Ile Asn Gly Thr Ala Glu Ala Leu Tyr Asn

65 70 75 80

Gly Gly Leu Leu Gly Cys Gln Ala Pro Val Gly Tyr Ala Ile Ser Leu

85 90 95

Val Met Gly Gly Leu Leu Phe Ala Lys Lys Met Arg Glu Glu Gly Tyr

100 105 110

Ile Thr Met Leu Asp Pro Phe Gln His Lys Tyr Gly Gln Arg Ile Gly

115 120 125

Gly Leu Met Tyr Val Pro Ala Leu Leu Gly Glu Thr Phe Trp Thr Ala

130 135 140

Ala Ile Leu Ser Ala Leu Gly Ala Thr Leu Ser Val Ile Leu Gly Ile

145 150 155 160

Asp Met Asn Ala Ser Val Thr Leu Ser Ala Cys Ile Ala Val Phe Tyr

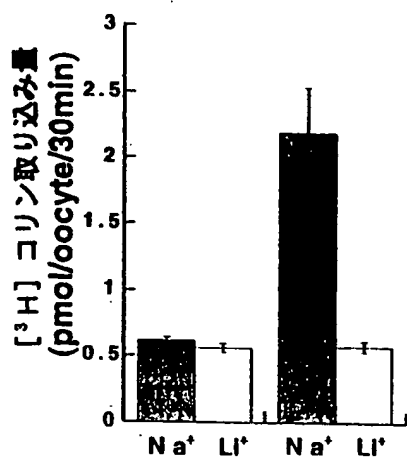
165 170 175

Thr Phe Thr Gly Gly Tyr Tyr Ala Val Ala Tyr Thr Asp Val Val Gln

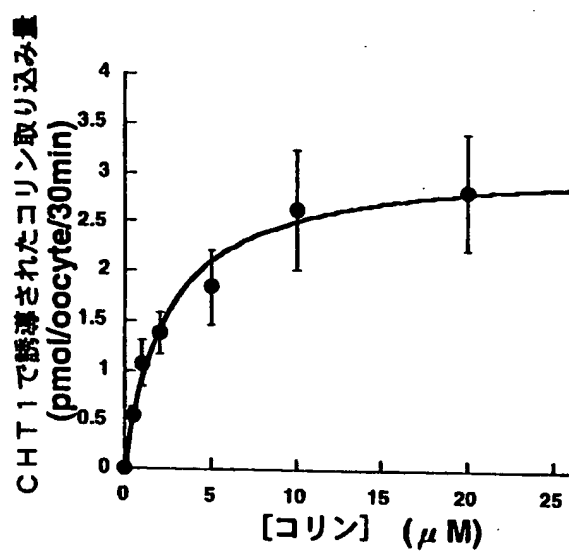
180 185 190

Leu Phe Cys Ile Phe Val Gly Leu Trp Val Cys Val Pro Ala Ala Met

第 11 図



第 12 図



195	200	205	
Val His Asp Gly Ala Lys Asp Ile Ser Arg Asn Ala Gly Asp Trp Ile			
210	215	220	
Gly Glu Ile Gly Gly Phe Lys Glu Thr Ser Leu Trp Ile Asp Cys Met			
225	230	235	240
Leu Leu Leu Val Phe Gly Gly Ile Pro Trp Gln Val Tyr Phe Gln Arg			
245	250	255	
Val Leu Ser Ser Lys Thr Ala His Gly Ala Gln Thr Leu Ser Phe Val			
260	265	270	
Ala Gly Val Gly Cys Ile Leu Met Ala Ile Pro Pro Ala Leu Ile Gly			
275	280	285	
Ala Ile Ala Arg Asn Thr Asp Trp Arg Met Thr Asp Tyr Ser Pro Trp			
290	295	300	
Asn Asn Gly Thr Lys Val Glu Ser Ile Pro Pro Asp Lys Arg Asn Met			
305	310	315	320
Val Val Pro Leu Val Phe Gln Tyr Leu Thr Pro Arg Trp Val Ala Phe			
325	330	335	
Ile Gly Leu Gly Ala Val Ser Ala Ala Val Met Ser Ser Ala Asp Ser			
340	345	350	
Ser Val Leu Ser Ala Ala Ser Met Phe Ala His Asn Ile Trp Lys Leu			
355	360	365	
Thr Ile Arg Pro His Ala Ser Glu Lys Glu Val Ile Ile Val Met Arg			
370	375	380	
Ile Ala Ile Ile Cys Val Gly Ile Met Ala Thr Ile Met Ala Leu Thr			
385	390	395	400
Ile Gln Ser Ile Tyr Gly Leu Trp Tyr Leu Cys Ala Asp Leu Val Tyr			
405	410	415	
Val Ile Leu Phe Pro Gln Leu Leu Cys Val Val Tyr Met Pro Arg Ser			
420	425	430	
Asn Thr Tyr Gly Ser Leu Ala Gly Tyr Ala Val Gly Leu Val Leu Arg			
435	440	445	
Leu Ile Gly Gly Glu Pro Leu Val Ser Leu Pro Ala Phe Phe His Tyr			
450	455	460	
Pro Met Tyr Thr Asp Gly Val Gln Tyr Phe Pro Phe Arg Thr Thr Ala			
465	470	475	480

Met Leu Ser Ser Met Ala Thr Ile Tyr Ile Val Ser Ile Gln Ser Glu  
 485 490 495  
 Lys Leu Phe Lys Ser Gly Arg Leu Ser Pro Glu Trp Asp Val Met Gly  
 500 505 510  
 Cys Val Val Asn Ile Pro Ile Asp His Val Pro Leu Pro Ser Asp Val  
 515 520 525  
 Ser Phe Ala Val Ser Ser Glu Thr Leu Asn Met Lys Ala Pro Asn Gly  
 530 535 540  
 Thr Pro Ala Pro Val His Pro Asn Gln Gln Pro Ser Asp Glu Asn Thr  
 545 550 555 560  
 Leu Leu His Pro Tyr Ser Asp Gln Ser Tyr Tyr Ser Thr Asn Ser Asn .  
 565 570 575

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1743

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1743)

&lt;400&gt; 3

atg cct ttc cat gta gaa gga cta gta gcg att atc ctg ttc tac ctt 48

Met Pro Phe His Val Glu Gly Leu Val Ala Ile Ile Leu Phe Tyr Leu

1 5 10 15

ctt ata ttt ctg gtt gga ata tgg gct gca tgg aaa acc aaa aac agc 96

Leu Ile Phe Leu Val Gly Ile Trp Ala Ala Trp Lys Thr Lys Asn Ser

20 25 30

ggt aat gca gaa gaa cgc agc gaa gcc atc ata gtt ggg ggc cga gac 144

Gly Asn Ala Glu Glu Arg Ser Glu Ala Ile Ile Val Gly Gly Arg Asp



35	40	45	
att ggt ttg ttg gtt ggt ggt ttt acc atg aca gcc acc tgg gtt gga			192
Ile Gly Leu Leu Val Gly Gly Phe Thr Met Thr Ala Thr Trp Val Gly			
50	55	60	
gga ggt tac atc aac ggg aca gct gaa gca gtt tat ggg cca ggt tgt			240
Gly Gly Tyr Ile Asn Gly Thr Ala Glu Ala Val Tyr Gly Pro Gly Cys			
65	70	75	80
ggt cta gct tgg gct cag gca ccc att gga tat tct ctg agt ctg att			288
Gly Leu Ala Trp Ala Gln Ala Pro Ile Gly Tyr Ser Leu Ser Leu Ile			
85	90	95	
tta ggt ggc ctg ttt ttt gca aaa cct atg cgt tcc aag gga tat gtg			336
Leu Gly Gly Leu Phe Phe Ala Lys Pro Met Arg Ser Lys Gly Tyr Val			
100	105	110	
act atg tta gac ccg ttt caa cag atc tat gga aag cgc atg ggt ggg			384
Thr Met Leu Asp Pro Phe Gln Gln Ile Tyr Gly Lys Arg Met Gly Gly			
115	120	125	
ctg ctg ttc atc cct gca ctg atg gga gag atg ttc tgg gct gca gca			432
Leu Leu Phe Ile Pro Ala Leu Met Gly Glu Met Phe Trp Ala Ala Ala			
130	135	140	
att ttc tct gca tta ggg gct acc atc agc gla atc att gat gtg gat			480
Ile Phe Ser Ala Leu Gly Ala Thr Ile Ser Val Ile Ile Asp Val Asp			
145	150	155	160
gtg aac ata tcg gtc att gtc tcc gca ctc att gcc att ctt tat acc			528
Val Asn Ile Ser Val Ile Val Ser Ala Leu Ile Ala Ile Leu Tyr Thr			
165	170	175	
ctc gtg gga ggg ctc tac tct gtg gca tat act gat gtt gla cag cta			576

Leu Val Gly Gly Leu Tyr Ser Val Ala Tyr Thr Asp Val Val Gln Leu  
 180 185 190

ttc tgc att ttt ata gga ttg tgg atc agt gtc cca ttt gcc ctg tca 624  
 Phe Cys Ile Phe Ile Gly Leu Trp Ile Ser Val Pro Phe Ala Leu Ser  
 195 200 205

cat cct gca gtc acc gac att gga ttc act gct gtg cat gct aaa tac 672  
 His Pro Ala Val Thr Asp Ile Gly Phe Thr Ala Val His Ala Lys Tyr  
 210 215 220

cag agt ccc tgg ctg gga acc att gaa tca gtt gaa gtc tac acc tgg 720  
 Gln Ser Pro Trp Leu Gly Thr Ile Glu Ser Val Glu Val Tyr Thr Trp  
 225 230 235 240

ctt gat aat ttt ctg ttg ttg atg ctg ggt gga ala cca tgg caa gcc 768  
 Leu Asp Asn Phe Leu Leu Leu Met Leu Gly Gly Ile Pro Trp Gln Ala  
 245 250 255

tac ttc cag agg gtc ctc tct tca tgc tca gcg acc tat gct cag gtg 816  
 Tyr Phe Gln Arg Val Leu Ser Ser Ser Ser Ala Thr Tyr Ala Gln Val  
 260 265 270

ctg tcc ttc ctg gca gct ttt ggg tgc ctg gtg atg gct cta cca gcc 864  
 Leu Ser Phe Leu Ala Ala Phe Gly Cys Leu Val Met Ala Leu Pro Ala  
 275 280 285

att tgc att ggg gcc att gga gcc tcc aca gac tgg aac caa act gca 912  
 Ile Cys Ile Gly Ala Ile Gly Ala Ser Thr Asp Trp Asn Gln Thr Ala  
 290 295 300

tat ggg ttt cca gat ccc aag acc aag gag gaa gca gac atg att ctc 960  
 Tyr Gly Phe Pro Asp Pro Lys Thr Lys Glu Glu Ala Asp Met Ile Leu  
 305 310 315 320

ccg att gtt cta cag tac ctc tgc cct gtg tac att tcc ttc ttt ggg 1008  
 Pro Ile Val Leu Gln Tyr Leu Cys Pro Val Tyr Ile Ser Phe Phe Gly  
 325 330 335

ctt ggt gct gtt tct gct gct gtc atg tcc tcg gct gac tca tcc atc 1056  
 Leu Gly Ala Val Ser Ala Ala Val Met Ser Ser Ala Asp Ser Ser Ile  
 340 345 350

cta tca gca agt tcc atg ttt gct cgg aat atc tac cag ctt tcc ttc 1104  
 Leu Ser Ala Ser Ser Met Phe Ala Arg Asn Ile Tyr Gln Leu Ser Phe  
 355 360 365

aga caa aat gca tca gac aag gaa att gtg tgg gtc atg agg atc act 1152  
 Arg Gln Asn Ala Ser Asp Lys Glu Ile Val Trp Val Met Arg Ile Thr  
 370 375 380

gtg ttt gtg ttt gga gca tct gca aca gcc atg gcc ttg ctc acg aag 1200  
 Val Phe Val Phe Gly Ala Ser Ala Thr Ala Met Ala Leu Leu Thr Lys  
 385 390 395 400

act gtg tat ggg ctc tgg tac ctg agc tct gac ctt gtc tac atc atc 1248  
 Thr Val Tyr Gly Leu Trp Tyr Leu Ser Ser Asp Leu Val Tyr Ile Ile  
 405 410 415

atc ttc cca cag ctg ctc tgt gta ctc ttc atc aaa gga acc aac act 1296  
 Ile Phe Pro Gln Leu Leu Cys Val Leu Phe Ile Lys Gly Thr Asn Thr  
 420 425 430

tat ggg gca gtt gct ggt tat att ttt gga ctt ttc ctg aga att acc 1344  
 Tyr Gly Ala Val Ala Gly Tyr Ile Phe Gly Leu Phe Leu Arg Ile Thr  
 435 440 445

gga gga gag cca tat cta tac ttg cag ccc tta atc ttc tac cct ggt 1392  
 Gly Gly Glu Pro Tyr Leu Tyr Leu Gln Pro Leu Ile Phe Tyr Pro Gly  
 450 455 460

tat tac cct gac aag aat ggt ata tac aat cag agg ttc cca ttt aaa 1440  
 Tyr Tyr Pro Asp Lys Asn Gly Ile Tyr Asn Gln Arg Phe Pro Phe Lys  
 465 470 475 480

act ctc tcc atg gtt acc tca ttc ttt acc aac att tgt gtt tcc tat 1488  
 Thr Leu Ser Met Val Thr Ser Phe Phe Thr Asn Ile Cys Val Ser Tyr  
 485 490 495

cta gcc aag tat cta ttt gaa agt gga acc tlg cct cca aaa tta gat 1536  
 Leu Ala Lys Tyr Leu Phe Glu Ser Gly Thr Leu Pro Pro Lys Leu Asp  
 500 505 510

ata ttt gat gct gtt gtc tca agg cac agt gaa gag aac atg gac aag 1584  
 Ile Phe Asp Ala Val Val Ser Arg His Ser Glu Glu Asn Met Asp Lys  
 515 520 525

acc att cta gtc aga aat gaa aac atc aaa tta aat gaa ctt gca cct 1632  
 Thr Ile Leu Val Arg Asn Glu Asn Ile Lys Leu Asn Glu Leu Ala Pro  
 530 535 540

gla aag cct cga cag agc cta acc ctc agt tca act ttc acc aat aaa 1680  
 Val Lys Pro Arg Gln Ser Leu Thr Leu Ser Ser Thr Phe Thr Asn Lys  
 545 550 555 560

gag gct ctc ctt gat gtt gat tcc agt cca gag gga tct ggg act gaa 1728  
 Glu Ala Leu Leu Asp Val Asp Ser Ser Pro Glu Gly Ser Gly Thr Glu  
 565 570 575

gat aac tta caa tga 1743  
 Asp Asn Leu Gln  
 580

<210> 4

&lt;211&gt; 580

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;400&gt; 4

```

Met Pro Phe His Val Glu Gly Leu Val Ala Ile Ile Leu Phe Tyr Leu
  1             5             10            15
Leu Ile Phe Leu Val Gly Ile Trp Ala Ala Trp Lys Thr Lys Asn Ser
      20             25            30
Gly Asn Ala Glu Glu Arg Ser Glu Ala Ile Ile Val Gly Gly Arg Asp
      35             40            45
Ile Gly Leu Leu Val Gly Gly Phe Thr Met Thr Ala Thr Trp Val Gly
      50             55            60
Gly Gly Tyr Ile Asn Gly Thr Ala Glu Ala Val Tyr Gly Pro Gly Cys
      65             70            75            80
Gly Leu Ala Trp Ala Gln Ala Pro Ile Gly Tyr Ser Leu Ser Leu Ile
      85             90            95
Leu Gly Gly Leu Phe Phe Ala Lys Pro Met Arg Ser Lys Gly Tyr Val
      100            105            110
Thr Met Leu Asp Pro Phe Gln Gln Ile Tyr Gly Lys Arg Met Gly Gly
      115            120            125
Leu Leu Phe Ile Pro Ala Leu Met Gly Glu Met Phe Trp Ala Ala Ala
      130            135            140
Ile Phe Ser Ala Leu Gly Ala Thr Ile Ser Val Ile Ile Asp Val Asp
      145            150            155            160
Val Asn Ile Ser Val Ile Val Ser Ala Leu Ile Ala Ile Leu Tyr Thr
      165            170            175
Leu Val Gly Gly Leu Tyr Ser Val Ala Tyr Thr Asp Val Val Gln Leu
      180            185            190
Phe Cys Ile Phe Ile Gly Leu Trp Ile Ser Val Pro Phe Ala Leu Ser
      195            200            205
His Pro Ala Val Thr Asp Ile Gly Phe Thr Ala Val His Ala Lys Tyr
      210            215            220
Gln Ser Pro Trp Leu Gly Thr Ile Glu Ser Val Glu Val Tyr Thr Trp
      225            230            235            240

```

Leu Asp Asn Phe Leu Leu Leu Met Leu Gly Gly Ile Pro Trp Gln Ala  
 245 250 255  
 Tyr Phe Gln Arg Val Leu Ser Ser Ser Ser Ala Thr Tyr Ala Gln Val  
 260 265 270  
 Leu Ser Phe Leu Ala Ala Phe Gly Cys Leu Val Met Ala Leu Pro Ala  
 275 280 285  
 Ile Cys Ile Gly Ala Ile Gly Ala Ser Thr Asp Trp Asn Gln Thr Ala  
 290 295 300  
 Tyr Gly Phe Pro Asp Pro Lys Thr Lys Glu Glu Ala Asp Met Ile Leu  
 305 310 315 320  
 Pro Ile Val Leu Gln Tyr Leu Cys Pro Val Tyr Ile Ser Phe Phe Gly  
 325 330 335  
 Leu Gly Ala Val Ser Ala Ala Val Met Ser Ser Ala Asp Ser Ser Ile  
 340 345 350  
 Leu Ser Ala Ser Ser Met Phe Ala Arg Asn Ile Tyr Gln Leu Ser Phe  
 355 360 365  
 Arg Gln Asn Ala Ser Asp Lys Glu Ile Val Trp Val Met Arg Ile Thr  
 370 375 380  
 Val Phe Val Phe Gly Ala Ser Ala Thr Ala Met Ala Leu Leu Thr Lys  
 385 390 395 400  
 Thr Val Tyr Gly Leu Trp Tyr Leu Ser Ser Asp Leu Val Tyr Ile Ile  
 405 410 415  
 Ile Phe Pro Gln Leu Leu Cys Val Leu Phe Ile Lys Gly Thr Asn Thr  
 420 425 430  
 Tyr Gly Ala Val Ala Gly Tyr Ile Phe Gly Leu Phe Leu Arg Ile Thr  
 435 440 445  
 Gly Gly Glu Pro Tyr Leu Tyr Leu Gln Pro Leu Ile Phe Tyr Pro Gly  
 450 455 460  
 Tyr Tyr Pro Asp Lys Asn Gly Ile Tyr Asn Gln Arg Phe Pro Phe Lys  
 465 470 475 480  
 Thr Leu Ser Met Val Thr Ser Phe Phe Thr Asn Ile Cys Val Ser Tyr  
 485 490 495  
 Leu Ala Lys Tyr Leu Phe Glu Ser Gly Thr Leu Pro Pro Lys Leu Asp  
 500 505 510  
 Ile Phe Asp Ala Val Val Ser Arg His Ser Glu Glu Asn Met Asp Lys

515                      520                      525  
 Thr Ile Leu Val Arg Asn Glu Asn Ile Lys Leu Asn Glu Leu Ala Pro  
 530                      535                      540  
 Val Lys Pro Arg Gln Ser Leu Thr Leu Ser Ser Thr Phe Thr Asn Lys  
 545                      550                      555                      560  
 Glu Ala Leu Leu Asp Val Asp Ser Ser Pro Glu Gly Ser Gly Thr Glu  
 565                      570                      575  
 Asp Asn Leu Gln  
 580

<210> 5

<211> 1743

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1743)

<400> 5

atg gct ttc cat gtg gaa gga ctg ata gct atc atc gtg ttc tac ctt 48

Met Ala Phe His Val Glu Gly Leu Ile Ala Ile Ile Val Phe Tyr Leu

1                      5                      10                      15

cta att ttg ctg gtt gga ala tgg gct gcc tgg aga acc aaa aac agt 96

Leu Ile Leu Leu Val Gly Ile Trp Ala Ala Trp Arg Thr Lys Asn Ser

20                      25                      30

ggc agc gca gaa gag cgc agc gaa gcc atc ala gtt ggt ggc cga gat 144

Gly Ser Ala Glu Glu Arg Ser Glu Ala Ile Ile Val Gly Gly Arg Asp

35                      40                      45

att ggt tta ttg gtt ggt gga ttt acc atg aca gct acc tgg gtc gga 192

Ile Gly Leu Leu Val Gly Gly Phe Thr Met Thr Ala Thr Trp Val Gly	
50 55 60	
gga ggg tat atc aat ggc aca gct gaa gca gtt tat gta cca ggt tat	240
Gly Gly Tyr Ile Asn Gly Thr Ala Glu Ala Val Tyr Val Pro Gly Tyr	
65 70 75 80	
ggc cta gct tgg gct cag gca cca att gga tat tct ctt agt ctg att	288
Gly Leu Ala Trp Ala Gln Ala Pro Ile Gly Tyr Ser Leu Ser Leu Ile	
85 90 95	
tta ggt ggc ctg ttc ttt gca aaa cct atg cgt tca aag ggg tat gtg	336
Leu Gly Gly Leu Phe Phe Ala Lys Pro Met Arg Ser Lys Gly Tyr Val	
100 105 110	
acc atg tta gac ccg ttt cag caa atc tat gga aaa cgc atg ggc gga	384
Thr Met Leu Asp Pro Phe Gln Gln Ile Tyr Gly Lys Arg Met Gly Gly	
115 120 125	
ctc ctg ttt att cct gca ctg atg gga gaa atg ttc tgg gct gca gca	432
Leu Leu Phe Ile Pro Ala Leu Met Gly Glu Met Phe Trp Ala Ala Ala	
130 135 140	
att ttc tct gct ttg gga gcc acc atc agc glg atc atc gat gtg gat	480
Ile Phe Ser Ala Leu Gly Ala Thr Ile Ser Val Ile Ile Asp Val Asp	
145 150 155 160	
atg cac att tct gtc atc atc tct gca ctc att gcc act ctg tac aca	528
Met His Ile Ser Val Ile Ile Ser Ala Leu Ile Ala Thr Leu Tyr Thr	
165 170 175	
ctg glg gga ggg ctc tat tct glg gcc tac act gat gtc gtt cag ctc	576
Leu Val Gly Gly Leu Tyr Ser Val Ala Tyr Thr Asp Val Val Gln Leu	
180 185 190	





ctt ggt gca gtt tct gct gct gtt atg tca tca gca gat tct tcc atc 1056  
 Leu Gly Ala Val Ser Ala Ala Val Met Ser Ser Ala Asp Ser Ser Ile  
 340 345 350

ttg tca gca agt tcc atg ttt gca cgg aac atc tac cag ctt tcc ttc 1104  
 Leu Ser Ala Ser Ser Met Phe Ala Arg Asn Ile Tyr Gln Leu Ser Phe  
 355 360 365

aga caa aat gct tcg gac aaa gaa atc gtt tgg gtt atg cga atc aca 1152  
 Arg Gln Asn Ala Ser Asp Lys Glu Ile Val Trp Val Met Arg Ile Thr  
 370 375 380

gtg ttt gtg ttt gga gca tct gca aca gcc atg gcc ttg ctg acg aaa 1200  
 Val Phe Val Phe Gly Ala Ser Ala Thr Ala Met Ala Leu Leu Thr Lys  
 385 390 395 400

act glg tat ggg ctc tgg tac ctc agt tct gac ctt gtt tac atc gtt 1248  
 Thr Val Tyr Gly Leu Trp Tyr Leu Ser Ser Asp Leu Val Tyr Ile Val  
 405 410 415

atc ttc ccc cag ctg ctt tgt gla ctc ttt gtt aag gga acc aac acc 1296  
 Ile Phe Pro Gln Leu Leu Cys Val Leu Phe Val Lys Gly Thr Asn Thr  
 420 425 430

tat ggg gcc gtg gca ggt tat gtt tct ggc ctc ttc ctg aga ata act 1344  
 Tyr Gly Ala Val Ala Gly Tyr Val Ser Gly Leu Phe Leu Arg Ile Thr  
 435 440 445

gga ggg gag cca tat ctg tat ctt cag ccc ttg atc ttc tac cct ggc 1392  
 Gly Gly Glu Pro Tyr Leu Tyr Leu Gln Pro Leu Ile Phe Tyr Pro Gly  
 450 455 460

tat tac cct gat gat aat ggt ata tat aat cag aaa ttt cca ttt aaa 1440  
 Tyr Tyr Pro Asp Asp Asn Gly Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Pro Phe Lys

465	470	475	480	
aca ctt gcc atg gtt aca tca ttc tta acc aac att tgc atc tcc tat				1488
Thr Leu Ala Met Val Thr Ser Phe Leu Thr Asn Ile Cys Ile Ser Tyr				
	485	490	495	
cta gcc aag tat cta ttt gaa agt gga acc tlg cca cct aaa tta gal				1536
Leu Ala Lys Tyr Leu Phe Glu Ser Gly Thr Leu Pro Pro Lys Leu Asp				
	500	505	510	
gta ttt gat gct gtt gtt gca aga cac agt gaa gaa aac atg gat aag				1584
Val Phe Asp Ala Val Val Ala Arg His Ser Glu Glu Asn Met Asp Lys				
	515	520	525	
aca att ctt gtc aaa aat gaa aat att aaa tta gat gaa ctt gca ctt				1632
Thr Ile Leu Val Lys Asn Glu Asn Ile Lys Leu Asp Glu Leu Ala Leu				
	530	535	540	
gtg aag cca cga cag agc atg acc ctc agc tca act ttc acc aat aaa				1680
Val Lys Pro Arg Gln Ser Met Thr Leu Ser Ser Thr Phe Thr Asn Lys				
545	550	555	560	
gag gcc ttc ctt gat gtt gat tcc agt cca gaa ggg tct ggg act gaa				1728
Glu Ala Phe Leu Asp Val Asp Ser Ser Pro Glu Gly Ser Gly Thr Glu				
	565	570	575	
gat aat tta cag tga				1743
Asp Asn Leu Gln				
	580			

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 580

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 6

Met Ala Phe His Val Glu Gly Leu Ile Ala Ile Ile Val Phe Tyr Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Ile Leu Leu Val Gly Ile Trp Ala Ala Trp Arg Thr Lys Asn Ser  
 20 25 30  
 Gly Ser Ala Glu Glu Arg Ser Glu Ala Ile Ile Val Gly Gly Arg Asp  
 35 40 45  
 Ile Gly Leu Leu Val Gly Gly Phe Thr Met Thr Ala Thr Trp Val Gly  
 50 55 60  
 Gly Gly Tyr Ile Asn Gly Thr Ala Glu Ala Val Tyr Val Pro Gly Tyr  
 65 70 75 80  
 Gly Leu Ala Trp Ala Gln Ala Pro Ile Gly Tyr Ser Leu Ser Leu Ile  
 85 90 95  
 Leu Gly Gly Leu Phe Phe Ala Lys Pro Met Arg Ser Lys Gly Tyr Val  
 100 105 110  
 Thr Met Leu Asp Pro Phe Gln Gln Ile Tyr Gly Lys Arg Met Gly Gly  
 115 120 125  
 Leu Leu Phe Ile Pro Ala Leu Met Gly Glu Met Phe Trp Ala Ala Ala  
 130 135 140  
 Ile Phe Ser Ala Leu Gly Ala Thr Ile Ser Val Ile Ile Asp Val Asp  
 145 150 155 160  
 Met His Ile Ser Val Ile Ile Ser Ala Leu Ile Ala Thr Leu Tyr Thr  
 165 170 175  
 Leu Val Gly Gly Leu Tyr Ser Val Ala Tyr Thr Asp Val Val Gln Leu  
 180 185 190  
 Phe Cys Ile Phe Val Gly Leu Trp Ile Ser Val Pro Phe Ala Leu Ser  
 195 200 205  
 His Pro Ala Val Ala Asp Ile Gly Phe Thr Ala Val His Ala Lys Tyr  
 210 215 220  
 Gln Lys Pro Trp Leu Gly Thr Val Asp Ser Ser Glu Val Tyr Ser Trp  
 225 230 235 240  
 Leu Asp Ser Phe Leu Leu Leu Met Leu Gly Gly Ile Pro Trp Gln Ala  
 245 250 255  
 Tyr Phe Gln Arg Val Leu Ser Ser Ser Ser Ala Thr Tyr Ala Gln Val

260	265	270
Leu Ser Phe Leu Ala Ala Phe Gly Cys Leu Val Met Ala Ile Pro Ala		
275	280	285
Ile Leu Ile Gly Ala Ile Gly Ala Ser Thr Asp Trp Asn Gln Thr Ala		
290	295	300
Tyr Gly Leu Pro Asp Pro Lys Thr Thr Glu Glu Ala Asp Met Ile Leu		
305	310	315
Pro Ile Val Leu Gln Tyr Leu Cys Pro Val Tyr Ile Ser Phe Phe Gly		
325	330	335
Leu Gly Ala Val Ser Ala Ala Val Met Ser Ser Ala Asp Ser Ser Ile		
340	345	350
Leu Ser Ala Ser Ser Met Phe Ala Arg Asn Ile Tyr Gln Leu Ser Phe		
355	360	365
Arg Gln Asn Ala Ser Asp Lys Glu Ile Val Trp Val Met Arg Ile Thr		
370	375	380
Val Phe Val Phe Gly Ala Ser Ala Thr Ala Met Ala Leu Leu Thr Lys		
385	390	395
Thr Val Tyr Gly Leu Trp Tyr Leu Ser Ser Asp Leu Val Tyr Ile Val		
405	410	415
Ile Phe Pro Gln Leu Leu Cys Val Leu Phe Val Lys Gly Thr Asn Thr		
420	425	430
Tyr Gly Ala Val Ala Gly Tyr Val Ser Gly Leu Phe Leu Arg Ile Thr		
435	440	445
Gly Gly Glu Pro Tyr Leu Tyr Leu Gln Pro Leu Ile Phe Tyr Pro Gly		
450	455	460
Tyr Tyr Pro Asp Asp Asn Gly Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Pro Phe Lys		
465	470	475
Thr Leu Ala Met Val Thr Ser Phe Leu Thr Asn Ile Cys Ile Ser Tyr		
485	490	495
Leu Ala Lys Tyr Leu Phe Glu Ser Gly Thr Leu Pro Pro Lys Leu Asp		
500	505	510
Val Phe Asp Ala Val Val Ala Arg His Ser Glu Glu Asn Met Asp Lys		
515	520	525
Thr Ile Leu Val Lys Asn Glu Asn Ile Lys Leu Asp Glu Leu Ala Leu		
530	535	540



gga ggc tac atc aat ggg aca gca gaa gca gtg tat ggg cca ggt tgt 240  
 Gly Gly Tyr Ile Asn Gly Thr Ala Glu Ala Val Tyr Gly Pro Gly Cys  
 65 70 75 80

ggt cta gct tgg gct cag gca ccc att gga tat tct ctg agt cta att 288  
 Gly Leu Ala Trp Ala Gln Ala Pro Ile Gly Tyr Ser Leu Ser Leu Ile  
 85 90 95

tta ggt ggt ctg ttt ttt gcg aaa cct atg cgt tcc aag gga tat gtg 336  
 Leu Gly Gly Leu Phe Phe Ala Lys Pro Met Arg Ser Lys Gly Tyr Val  
 100 105 110

act atg tta gac cca ttt caa cag atc tat gga aag cgc atg ggt ggg 384  
 Thr Met Leu Asp Pro Phe Gln Gln Ile Tyr Gly Lys Arg Met Gly Gly  
 115 120 125

ctg ctc ttc atc cct gca ctg atg gga gag atg ttc tgg gct gca gca 432  
 Leu Leu Phe Ile Pro Ala Leu Met Gly Glu Met Phe Trp Ala Ala Ala  
 130 135 140

att ttc tct gca tta ggg gcc acc atc agc gtg atc att gat gtg gat 480  
 Ile Phe Ser Ala Leu Gly Ala Thr Ile Ser Val Ile Ile Asp Val Asp  
 145 150 155 160

gtg aac ata tgg gtc att gtc tct gca ctc att gcc att ctt tat acc 528  
 Val Asn Ile Ser Val Ile Val Ser Ala Leu Ile Ala Ile Leu Tyr Thr  
 165 170 175

cta gtg ggt ggg ctc tac tct gtg gca tat act gat gtt gtc cag cta 576  
 Leu Val Gly Gly Leu Tyr Ser Val Ala Tyr Thr Asp Val Val Gln Leu  
 180 185 190

ttc tgc att ttt ata gga ctg tgg atc agt gtc cct ttt gcc ctg tca 624  
 Phe Cys Ile Phe Ile Gly Leu Trp Ile Ser Val Pro Phe Ala Leu Ser  
 195 200 205

cat cct gca gtc acc gac atc gga ttc aca gct gtg cat gct aaa tac 672  
 His Pro Ala Val Thr Asp Ile Gly Phe Thr Ala Val His Ala Lys Tyr  
 210 215 220

cag agt ccc tgg ctg gga acc att gaa tca gtt gaa gtc tac acc tgg 720  
 Gln Ser Pro Trp Leu Gly Thr Ile Glu Ser Val Glu Val Tyr Thr Trp  
 225 230 235 240

ctt gat aat ttt ctg tta ttg atg ctg ggt gga atc cca tgg caa gcc 768  
 Leu Asp Asn Phe Leu Leu Leu Met Leu Gly Gly Ile Pro Trp Gln Ala  
 245 250 255

tac ttc cag agg gtc ctc tct tca tcc tca gcc acc tat gct cag gta 816  
 Tyr Phe Gln Arg Val Leu Ser Ser Ser Ser Ala Thr Tyr Ala Gln Val  
 260 265 270

ctg tcc ttc ctg gca gct ttt ggg tgc ctg gtg atg gct cta ccc gcc 864  
 Leu Ser Phe Leu Ala Ala Phe Gly Cys Leu Val Met Ala Leu Pro Ala  
 275 280 285

ata tgc ata gga gct att gga gct tcc aca gac tgg aac cag act gcc 912  
 Ile Cys Ile Gly Ala Ile Gly Ala Ser Thr Asp Trp Asn Gln Thr Ala  
 290 295 300

tac ggg tal cca gat ccc aag act aag gag gaa gca gac atg att ctc 960  
 Tyr Gly Tyr Pro Asp Pro Lys Thr Lys Glu Glu Ala Asp Met Ile Leu  
 305 310 315 320

ccg atc gtt ctg cag tac ctc tgc cct gtg tac atc tcc ttc ttt ggg 1008  
 Pro Ile Val Leu Gln Tyr Leu Cys Pro Val Tyr Ile Ser Phe Phe Gly  
 325 330 335

ctt ggt gct gtt tca gct gct gtc atg tcc tca gct gac tcg tcc atc 1056  
 Leu Gly Ala Val Ser Ala Ala Val Met Ser Ser Ala Asp Ser Ser Ile



340	345	350	
cig tcg gcg agt tct atg ttt gct cgg aat atc tac cag ctt tcc ttc			1104
Leu Ser Ala Ser Ser Met Phe Ala Arg Asn Ile Tyr Gln Leu Ser Phe			
355	360	365	
aga caa aat gca tca gac aag gaa att gtg tgg gtc atg agg atc act			1152
Arg Gln Asn Ala Ser Asp Lys Glu Ile Val Trp Val Met Arg Ile Thr			
370	375	380	
gig ctt gtg ttc gga gca tct gca aca gcc atg gct ttg ctg acg aag			1200
Val Leu Val Phe Gly Ala Ser Ala Thr Ala Met Ala Leu Leu Thr Lys			
385	390	395	400
act gig tat ggg ctc tgg tac ctg agc tct gac ctt gtc tac atc atc			1248
Thr Val Tyr Gly Leu Trp Tyr Leu Ser Ser Asp Leu Val Tyr Ile Ile			
405	410	415	
atc ttc cca cag ctg ctc tgt gta ctc ttc atc aaa gga acc aac act			1296
Ile Phe Pro Gln Leu Leu Cys Val Leu Phe Ile Lys Gly Thr Asn Thr			
420	425	430	
tat ggg gca gtt gct ggt tat att ttt gga cta ttc ctg aga att act			1344
Tyr Gly Ala Val Ala Gly Tyr Ile Phe Gly Leu Phe Leu Arg Ile Thr			
435	440	445	
gga gga gag cca tat cta tac ttg cag ccc tta atc ttc tac cct ggt			1392
Gly Gly Glu Pro Tyr Leu Tyr Leu Gln Pro Leu Ile Phe Tyr Pro Gly			
450	455	460	
tat tac tct gac aag aat ggt ata tac aat cag agg ttc cca ttt aaa			1440
Tyr Tyr Ser Asp Lys Asn Gly Ile Tyr Asn Gln Arg Phe Pro Phe Lys			
465	470	475	480
act ctc tcc atg gtt acc tca ttc ttt acc aac att tgt gtt tct tat			1488

Thr Leu Ser Met Val Thr Ser Phe Phe Thr Asn Ile Cys Val Ser Tyr  
 485 490 495

cta gcc aag tat cta ttt gaa agt gga acc ttg cct cca aaa tta gat 1536  
 Leu Ala Lys Tyr Leu Phe Glu Ser Gly Thr Leu Pro Pro Lys Leu Asp  
 500 505 510

gia ttt gat gct gtt gtc gca agg cac agt gaa gag aac atg gac aag 1584  
 Val Phe Asp Ala Val Val Ala Arg His Ser Glu Glu Asn Met Asp Lys  
 515 520 525

acc att cta gtc aga aat gaa aat atc aaa tta aat gaa ctt gca cct 1632  
 Thr Ile Leu Val Arg Asn Glu Asn Ile Lys Leu Asn Glu Leu Ala Pro  
 530 535 540

gtg aaa cct cgg cag agc cta acc ctc agt tca act ttc acc aat aag 1680  
 Val Lys Pro Arg Gln Ser Leu Thr Leu Ser Ser Thr Phe Thr Asn Lys  
 545 550 555 560

gag gcc ctc ctt gat gtt gat tcc agt ccg gag ggg tct ggg act gaa 1728  
 Glu Ala Leu Leu Asp Val Asp Ser Ser Pro Glu Gly Ser Gly Thr Glu  
 565 570 575

gat aac tta caa tga 1743  
 Asp Asn Leu Gln  
 580

<210> 8

<211> 580

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Met Ser Phe His Val Glu Gly Leu Val Ala Ile Ile Leu Phe Tyr Leu

1	5	10	15
Leu Ile Phe Leu Val Gly Ile Trp Ala Ala Trp Lys Thr Lys Asn Ser			
20	25	30	
Gly Asn Pro Glu Glu His Ser Glu Ala Ile Ile Val Gly Gly Arg Asp			
35	40	45	
Ile Gly Leu Leu Val Gly Gly Phe Thr Met Thr Ala Thr Trp Val Gly			
50	55	60	
Gly Gly Tyr Ile Asn Gly Thr Ala Glu Ala Val Tyr Gly Pro Gly Cys			
65	70	75	80
Gly Leu Ala Trp Ala Gln Ala Pro Ile Gly Tyr Ser Leu Ser Leu Ile			
85	90	95	
Leu Gly Gly Leu Phe Phe Ala Lys Pro Met Arg Ser Lys Gly Tyr Val			
100	105	110	
Thr Met Leu Asp Pro Phe Gln Gln Ile Tyr Gly Lys Arg Met Gly Gly			
115	120	125	
Leu Leu Phe Ile Pro Ala Leu Met Gly Glu Met Phe Trp Ala Ala Ala			
130	135	140	
Ile Phe Ser Ala Leu Gly Ala Thr Ile Ser Val Ile Ile Asp Val Asp			
145	150	155	160
Val Asn Ile Ser Val Ile Val Ser Ala Leu Ile Ala Ile Leu Tyr Thr			
165	170	175	
Leu Val Gly Gly Leu Tyr Ser Val Ala Tyr Thr Asp Val Val Gln Leu			
180	185	190	
Phe Cys Ile Phe Ile Gly Leu Trp Ile Ser Val Pro Phe Ala Leu Ser			
195	200	205	
His Pro Ala Val Thr Asp Ile Gly Phe Thr Ala Val His Ala Lys Tyr			
210	215	220	
Gln Ser Pro Trp Leu Gly Thr Ile Glu Ser Val Glu Val Tyr Thr Trp			
225	230	235	240
Leu Asp Asn Phe Leu Leu Leu Met Leu Gly Gly Ile Pro Trp Gln Ala			
245	250	255	
Tyr Phe Gln Arg Val Leu Ser Ser Ser Ser Ala Thr Tyr Ala Gln Val			
260	265	270	
Leu Ser Phe Leu Ala Ala Phe Gly Cys Leu Val Met Ala Leu Pro Ala			
275	280	285	

Ile Cys Ile Gly Ala Ile Gly Ala Ser Thr Asp Trp Asn Gln Thr Ala  
 290 295 300  
 Tyr Gly Tyr Pro Asp Pro Lys Thr Lys Glu Glu Ala Asp Met Ile Leu  
 305 310 315 320  
 Pro Ile Val Leu Gln Tyr Leu Cys Pro Val Tyr Ile Ser Phe Phe Gly  
 325 330 335  
 Leu Gly Ala Val Ser Ala Ala Val Met Ser Ser Ala Asp Ser Ser Ile  
 340 345 350  
 Leu Ser Ala Ser Ser Met Phe Ala Arg Asn Ile Tyr Gln Leu Ser Phe  
 355 360 365  
 Arg Gln Asn Ala Ser Asp Lys Glu Ile Val Trp Val Met Arg Ile Thr  
 370 375 380  
 Val Leu Val Phe Gly Ala Ser Ala Thr Ala Met Ala Leu Leu Thr Lys  
 385 390 395 400  
 Thr Val Tyr Gly Leu Trp Tyr Leu Ser Ser Asp Leu Val Tyr Ile Ile  
 405 410 415  
 Ile Phe Pro Gln Leu Leu Cys Val Leu Phe Ile Lys Gly Thr Asn Thr  
 420 425 430  
 Tyr Gly Ala Val Ala Gly Tyr Ile Phe Gly Leu Phe Leu Arg Ile Thr  
 435 440 445  
 Gly Gly Glu Pro Tyr Leu Tyr Leu Gln Pro Leu Ile Phe Tyr Pro Gly  
 450 455 460  
 Tyr Tyr Ser Asp Lys Asn Gly Ile Tyr Asn Gln Arg Phe Pro Phe Lys  
 465 470 475 480  
 Thr Leu Ser Met Val Thr Ser Phe Phe Thr Asn Ile Cys Val Ser Tyr  
 485 490 495  
 Leu Ala Lys Tyr Leu Phe Glu Ser Gly Thr Leu Pro Pro Lys Leu Asp  
 500 505 510  
 Val Phe Asp Ala Val Val Ala Arg His Ser Glu Glu Asn Met Asp Lys  
 515 520 525  
 Thr Ile Leu Val Arg Asn Glu Asn Ile Lys Leu Asn Glu Leu Ala Pro  
 530 535 540  
 Val Lys Pro Arg Gln Ser Leu Thr Leu Ser Ser Thr Phe Thr Asn Lys  
 545 550 555 560  
 Glu Ala Leu Leu Asp Val Asp Ser Ser Pro Glu Gly Ser Gly Thr Glu

	565	570	575
Asp Asn Leu Gln			
580			

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05545

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/47, C12Q1/68, C07K19/00,  
C07K16/18, C12N5/10 A61K38/17, A61K45/00, A61P25/28, G01N33/53,  
A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/47, C12Q1/68, C07K19/00,  
C07K16/18, C12N5/10 A61K38/17, A61K45/00, A61P25/28, G01N33/53,  
A01K67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,  
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Okuda T. et al., "Identification and characterization of the high-affinity choline transporter", Nal. Neurosci. (2000) Vol.3, No.2, pp.120-125	1-60, 62, 63
X	Knipper M. et al., "Purification and reconstitution of the highaffinity choline transporter", Biochimica et Biophysica Acta (1991) Vol.1065, No.2, pp.107-113	1-60, 62, 63
A	Andresen P. A. et al., "Molecular cloning, physical mapping and expression of the bet genes governing the osmoregulatorycholine-glycine betaine pathway of <i>Escherichia coli</i> ", Journal of General Microbiology (1988) Vol.134, No.6, pp.1737-1746	1-60, 62, 63
A	Pocard J-A. et al., "Molecular characterization of the bet genes encoding glycine betaine synthesis in <i>Sinorhizobium meliloti</i> 102F34", Microbiology (1997) Vol.143, No.4, pp.1369-1379	1-60, 62, 63

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
10 November, 2000 (10.11.00)

Date of mailing of the international search report  
21 November, 2000 (21.11.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05545

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 61  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
Claim 61 pertains to diagnostic methods practiced on the human body and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> C12N15/12, C07K14/47, C12Q1/68, C07K19/00,  
C07K16/18, C12N5/10, A61K38/17, A61K45/00,  
A61P25/28, G01N33/53, A01K67/027

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> C12N15/12, C07K14/47, C12Q1/68, C07K19/00,  
C07K16/18, C12N5/10, A61K38/17, A61K45/00,  
A61P25/28, G01N33/53, A01K67/027

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,  
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	Okuda, T. et al. "Identification and characterization of the high-affinity choline transporter" Nal. Neurosci. (2000) Vol. 3 No. 2 P. 120-125	1-60, 62, 63
X	Knipper, M. et al. "Purification and reconstitution of the high affinity choline transporter" Biochimica et Biophysica Acta (1991) Vol. 1065 No. 2 P. 107-113	1-60, 62, 63

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.11.00

国際調査報告の発送日

21.11.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

印

4B 9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Andresen, P. A. et al. "Molecular cloning, physical mapping and expression of the <i>bet</i> genes governing the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of <i>Escherichia coli</i> " Journal of General Microbiology (1988) Vol. 134 No. 6 P. 1737-1746	1-60, 62, 63
A	Pocard, J-A. et al. "Molecular characterization of the <i>bet</i> genes encoding glycine betaine synthesis in <i>Sinorhizobium meliloti</i> 102F34" Microbiology (1997) Vol. 143 No. 4 P. 1369-1379	1-60, 62, 63

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 61 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
請求の範囲61は、人の診断方法に係る発明であるから、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲                                  は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲                                  は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。